



Universidad Nacional de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

“Análisis de los Mecanismos Celulares y Moleculares Implicados en el
Rechazo Celular Agudo del Trasplante Intestinal Humano”

Tesis para optar al título de Doctor

Doctorando: Lic. Melisa Pucci Molineris

Director: Dr. Dominik Meier

Co-Director: Dr. Gabriel E. Gondolessi

Consejera: Dra. Élide Álvarez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Traslacional e Inmunología
Asociada al Trasplante

Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y BioIngeniería (IMETTYB);
Universidad Favaloro-CONICET



2018

Dedicada a mi hija Antonia,
al amor de mi vida Leandro
y a mis abuelos
Tolo, Osvaldo y Ana.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Gondolesi, por abrirme las puertas de una institución a la cual es un orgullo pertenecer, por compartir conmigo su experticia en el tema y por hacerle un lugar al pequeño científico que vive en mí en un mar de médicos.

Al Dr. Dominik Meier, por permitirme crecer y desarrollarme a su lado a lo largo de estos 5 años. Especialmente, por haber invertido tanto tiempo en corregir con dedicación el presente trabajo.

A la Dra. Élica Álvarez, por haberme acompañado y ayudado tanto en este último tramo del trabajo y por haber dedicado su tiempo a leer el manuscrito.

Al Dr. Martín Rumbo, por su invaluable aporte al trabajo y a mi desarrollo personal, por su colaboración constante y por permitirme el acceso a las instalaciones del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) de la Universidad Nacional de La Plata. A través suyo, también quiero agradecer a todos los integrantes del IIFP, quienes siempre han tenido buena predisposición para conmigo y me han ayudado siempre que lo requerí.

Al Dr. Alberto Crottogini y a todos los miembros del Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería de la Universidad Favaloro, especialmente a Sebastián, Daniela, Paola, Luis, Jorge, Elena, por su ayuda incondicional y desinteresada y por hacer más ameno el día a día.

A la Universidad Favaloro, por albergar a nuestro grupo de investigación y cedernos un espacio para la realización de nuestras actividades.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por haberme otorgado las becas que me permitieron dedicarme con exclusividad a la realización de este trabajo.

A todos los integrantes de la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del Hospital Universitario Fundación Favaloro (HUFF), desde los secretarios hasta el staff médico, por haberme enseñado tanto, por la compañía y el apoyo que supieron darme.

A los endoscopistas, anestesistas e instrumentadoras del servicio de Gastroenterología del HUFF, por la colaboración para la recolección de muestras utilizadas en el protocolo.

Al servicio de Patología del HUFF, por compartimos su espacio para que podamos trabajar, por estar siempre dispuestos a evacuar nuestras consultas y por todo el tiempo compartido. Quiero agradecer especialmente a Rosana Valverdi, por haber sido más que una compañera y por su aporte como profesional que fue fundamental para este trabajo.

A todos los pacientes que colaboraron con nosotros, por confiar y por ser generosos con los demás aún en situaciones críticas.

A la Dra. Melina Rapacioli y al Dr. Vladimir Flores, por dejarme comenzar a su lado el desafiante camino de la docencia universitaria.

A mis compañeros, Pablo, Sabrina, Virginia y Agustina por todos los momentos compartidos y por tener siempre una palabra de aliento. Grandes personas y profesionales que tengo el honor de tener de amigos.

A Leandro, por haberme acompañado todo este tiempo, por sostenerme siempre y por empujarme cada vez que me quedaba atrás. Sin su amor y su incondicional apoyo, nada hubiera sido posible. Te amo, sos el mejor compañero que alguien puede tener.

A mis papás, por inculcarme el trabajo, la humildad, la tenacidad, la bondad y el amor, entre tantas otras cosas. Por apoyar cada uno de mis cambios de rumbo y por estar ahí... firmes, como siempre. Los amo.

A mis hermanos, por tirar conmigo para adelante, por cada llamada, por cada mensaje, porque siempre se las arreglan para estar. Los amo con el alma.

A mis amigas, Maru y Rochi, por haberme ayudado a compaginar este trabajo y por haberme acompañado a la distancia en estos años tan importantes. Las adoro.

DIFUSIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

Publicaciones en revistas indexadas

Pucci Molineris M; González Polo V; Perez F; Ramisch D; Rumbo M; Gondolessi G; Meier D.
“Paneth and Intestinal Stem Cells Preserve their Functional Integrity during Worsening of Acute Cellular Rejection in Small Bowel Transplantation.” Am J Transplant. 2017; 1–9.
doi: 10.1111/ajt.14592. (q1)

Presentaciones a congresos

(en calidad de primer autor)

2017

- **XXIV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante** – Montevideo, Uruguay. Del 3 al 6 de Septiembre de 2017.
Presentación Oral: Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en la disminución de la producción de interleuquina-22 durante el rechazo agudo.
- **XV International Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplant Association** – Nueva York, Estados Unidos. Del 28 de Junio al 1 de Julio.
Presentación Oral: Paneth and stem cells are not affected during initial stages of acute cellular rejection in small bowel transplantation in humans.

2016

- **XIII Congreso Argentino de Trasplante** – Mar del Plata, Argentina. Del 11 al 13 de Mayo.
Presentación Oral: Las Células Epiteliales de La Zona De Amplificación En Tránsito Son Las Principales Afectadas Durante Episodios De Rechazo Celular Agudo En Pacientes Con Trasplante Intestinal.
- **XIII Congreso Argentino de Trasplante** – Mar del Plata, Argentina. Del 11 al 13 de Mayo.
Presentación Oral: Análisis de Las Células Linfoides Innatas Durante El Seguimiento De Pacientes Con Trasplante Intestinal. Estudio Preliminar.

2015

- **II Reunión Franco-Argentino de Inmunología, SAI** – Capital Federal, Argentina. Del 18 al 21 de Noviembre.

Presentación de póster: Analysis of innate lymphoid cells during the follow-up of intestinal transplant patients: a preliminary study.

- **XIV Simposio Internacional de Trasplante de Intestino, ISBTS 2015** – Capital Federal, Argentina. Del 10 al 13 de Junio.

Presentación Oral: Analysis of innate lymphoid cells during the follow-up of intestinal transplant patients: a preliminary study.

2014

- **LVI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)** – Mar del Plata, Argentina. Del 19 al 21 de Noviembre.

Presentación de póster: Analysis of innate lymphoid cells during the follow-up of intestinal transplant patients.

Premios recibidos

2018

- **Mentor- Mentee Award** – 27th International Congress of the Transplantation Society. Madrid, España. Del 30 de Junio al 5 de Julio de 2018.

2017

- **Primer Premio Avances en Transplantología 2017** – Fundación Florencio Fiorini. Buenos Aires, Argentina. 5 de Octubre de 2017.
- **Young Scientific Award** - XV International Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplant Association. Nuevo York, EEUU. Del 28 de Junio al 2 de Julio de 2017.

ABREVIATURAS

Tx: Trasplante	CLIx: Células linfoides innatas subgrupo x
Txl: Trasplante intestinal	NCR: del inglés, <i>Natural cytotoxic receptor</i>
TxMV: Trasplante multivisceral	NK: Células <i>Natural Killer</i>
TxMVM: Trasplante multivisceral modificado	CPA: Célula presentadora de antígenos
posTxI: Postrasplante intestina	RCT: Recepto célula T
RCA: Rechazo celular agudo	IFN γ : Interferón γ
ISC: del inglés, <i>Intestinal stem cells</i>	FNT: Factor de necrosis tumoral
CP: Células de Paneth	GM-CSF: del inglés, <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
ZAT: Zona de amplificación en tránsito	IL-x: Interleuquina x
ZF: Zona fondo	CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad
MALT: del inglés, <i>Mucosa- Associated Lymphoid Tissue</i>	HLA: del inglés, <i>Human Lymphocyte antigen</i>
GALT: del inglés, <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>	AED: Anticuerpos específicos contra donante
FLA: Folículo linfoide aislado	CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento
PP: Placa de Peyer	CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
GLM: Ganglio linfático mesentérico	ARP: Anticuerpos reactivos contra panel
LT: Linfocito T	PCV: Prueba cruzada virtual
Thx: Linfocito T colaborador o <i>helper</i>	PMAD: Patrones moleculares aociados al daño
Treg: Linfocito T regulador	RPP: Receptores de reconocimiento de patrones
LTC: Linfocito T citotóxico	EROs: Especies reactivas del oxígeno
LB: Linfocito B	II: Insuficiencia intestinal
CD: Célula dendrítica	IIC: Insuficiencia intestinal crónica
M ϕ : Macrófago	
LIE: Linfocitos intraepiteliales	
CLI: Células linfoides innatas	

SIC: Síndrome de intestino corto

NP: Nutrición parenteral

NPT: Nutrición parenteral total

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

DLPT: Desorden linfoproliferativo

IIR: Injuria por isquemia-reperfusión

DEFA5: α defensina 5

LYZ: Lisozima

CASP3: Caspasa3

Bx: Biopsia

TxIN: Pacientes Tlx de histología normal

TxIRL: Pacientes Tlx con rechazo leve

TxIRM: Pacientes Tlx con rechazo moderado

TxIRS: Pacientes Tlx con rechazo severo

IL-22R: Receptor de interleuquina 22

LGR5: Receptor 5 acoplado a proteína G rico en repeticiones de leucina

Tac: Tacrolimus

Sir: Sirolimus

MMF: Micofenolato

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ESQUEMA ORGANIZATIVO DE LA TESIS	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
Anatomía, histología y fisiología del intestino delgado	4
Sistema inmune de la mucosa.....	8
Inmunología asociada al trasplante.....	15
Trasplante intestinal	29
OBJETIVO GENERAL.....	47
Objetivos específicos	47
CAPÍTULO I: Análisis de los blancos celulares del rechazo celular agudo en la cripta intestinal.....	38
CAPÍTULO II: Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en el Trasplante intestinal.....	73
DISCUSIÓN GENERAL.....	100
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	106
BIBLIOGRAFÍA	109

ÍNDICE DETALLADO

RESUMEN.....	1
ESQUEMA ORGANIZATIVO DE LA TESIS	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
Anatomía, histología y fisiología del intestino delgado	4
I-Generalidades	4
I-Anatomía del intestino delgado	5
III-Histología del intestino delgado	6
Sistema inmune de la mucosa	8
I-GALT: Sitios inductores	9
II-Células efectoras de la mucosa intestinal	10
Inmunología asociada al trasplante.....	15
I-Bases de la aloinmunidad	15
II-Estudios de histocompatibilidad.....	20
III-Rechazo de injertos.....	25
IV-Terapia inmunosupresora.....	27
Trasplante Intestinal	29
I-Insuficiencia intestinal.....	29
II-Soporte nutricional y rehabilitación.....	31
III-Trasplante intestinal: indicaciones y contraindicaciones.....	33
IV-El trasplante intestinal en números.....	36
V-Particularidades inmunológicas del trasplante intestinal e Inmunosupresión...	38
VI-Complicaciones del trasplante intestinal	41
VII-Seguimiento postrasplante.....	45
OBJETIVO GENERAL.....	47
Objetivos específicos	47

CAPÍTULO I: Análisis de los blancos celulares del rechazo celular agudo en la cripta intestinal	48
Introducción	48
I-Rechazo celular agudo y diagnóstico en trasplante intestinal.....	48
II-La cripta intestinal	52
Materiales y métodos	54
I-Pacientes.....	54
II-Inmunohistología.....	55
III-Recuento de células en biopsias de intestino delgado	56
IV-Análisis de la expresión génica	56
V-Análisis estadístico.....	57
Resultados	59
I-Las células de Paneth permanecen intactas durante episodios de rechazo celular agudo.....	59
II-La zona de amplificación en tránsito se ve más afectada que la zona del fondo de la cripta por el fenómeno de apoptosis secundario al rechazo celular agudo.....	61
III-Las células madre intestinales no se ven alteradas durante eventos de rechazo celular agudo	63
IV-La capacidad proliferativa de las células madre no se ve perjudicada durante el rechazo celular agudo	65
V-Rechazo celular agudo en trasplante intestinal versus otras patologías inflamatorias intestinales	65
Discusión	69
CAPÍTULO II: Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en el trasplante intestinal	73
Introducción	73
I-Las células linfoides innatas	73
II-Células linfoides innatas del grupo 3 posnatales	74
III-Rol de las células linfoides subgrupo 3 en patologías intestinales.....	76

IV-Eje IL-22/ IL-22R.....	77
Materiales y Métodos	79
I-Pacientes.....	79
II-Aislamiento de linfocitos de lámina propia de biopsias intestinales	81
III-Enriquecimiento de las muestras en CLIs	82
IV-Análisis de células innatas mediante citometría de flujo	82
V-Purificación de CLI3s a partir de amígdalas.....	83
VI-Ensayo de inducción en CLI3s purificadas	84
VII-Análisis de la expresión génica.....	85
VIII-Análisis estadístico	86
Resultados	87
I-Las células linfoides innatas no se ven afectadas por el esquema de inmunosupresión.....	87
II-La frecuencia de CLI3s NCR ⁺ y el nivel del interleuquina 22 disminuyen durante los eventos de rechazo celular agudo.....	89
III-Perfil de los linfocitos T CD4 ⁺ en el rechazo celular agudo.....	91
IV-Las células linfoides innatas y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.	93
V-CD56 vs NKp44 en CLI3s de amígdalas.....	94
Discusión	95
DISCUSIÓN GENERAL.....	100
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.....	106
BIBLIOGRAFÍA	109

RESUMEN

El trasplante intestinal (TxI) constituye una opción terapéutica válida para aquellos pacientes con insuficiencia intestinal crónica e irreversible que han desarrollado complicaciones a la nutrición parenteral. La calidad de vida de los pacientes mejora pero deberán utilizar, diariamente y de por vida, fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo celular agudo (RCA).

Si bien la aplicación de distintos protocolos de inmunosupresión ha permitido mejorar los resultados e incrementar la aplicabilidad del TxI, la incidencia del RCA es mayor que en otros órganos y continúa siendo causa, tanto temprana como alejada, de pérdida del injerto y necesidad de retrasplante. Según reportes de distintos centros, un porcentaje superior al 50% de los pacientes sufrirá episodios de rechazo en los primeros meses postrasplante. La severidad del rechazo puede variar desde leve, donde se detectan anomalías histológicas menores tales como el aumento del número de células apoptóticas en las criptas, a severo en el que se observa alteración completa de la arquitectura de la mucosa. En el mismo se evidencia la ausencia de criptas y vellosidades y la pérdida parcial o completa del epitelio. En el rechazo severo exfoliativo se pierde la integridad de la barrera epitelial intestinal, la translocación bacteriana es posible y el riesgo de muerte por sepsis en un contexto de inmunosupresión es muy alto.

Por tal motivo, aumentar el conocimiento acerca de los eventos celulares y moleculares que intervienen en el RCA permitirá adoptar nuevas estrategias para el diagnóstico temprano, el tratamiento y el seguimiento del paciente.

En el *Capítulo 1* del presente trabajo, se investigaron los blancos celulares de la apoptosis en la cripta intestinal durante el RCA. Mediante cortes de biopsias incluidas en parafina empleadas para el monitoreo histológico del injerto, se detectaron y cuantificaron mediante técnicas inmunohistológicas las células componentes de la zona del fondo (ZF) de la criptas: las células de Paneth y las células madre intestinales. Además, se evaluó si la zona más afectada por el RCA es la zona del fondo o aquella compuesta por intermediarios de diferenciación, la zona de amplificación en tránsito (ZAT), utilizando caspasa-3 como marcador de apoptosis. Finalmente, se realiza la comparación del RCA con otras patologías intestinales con afección a nivel de las criptas.

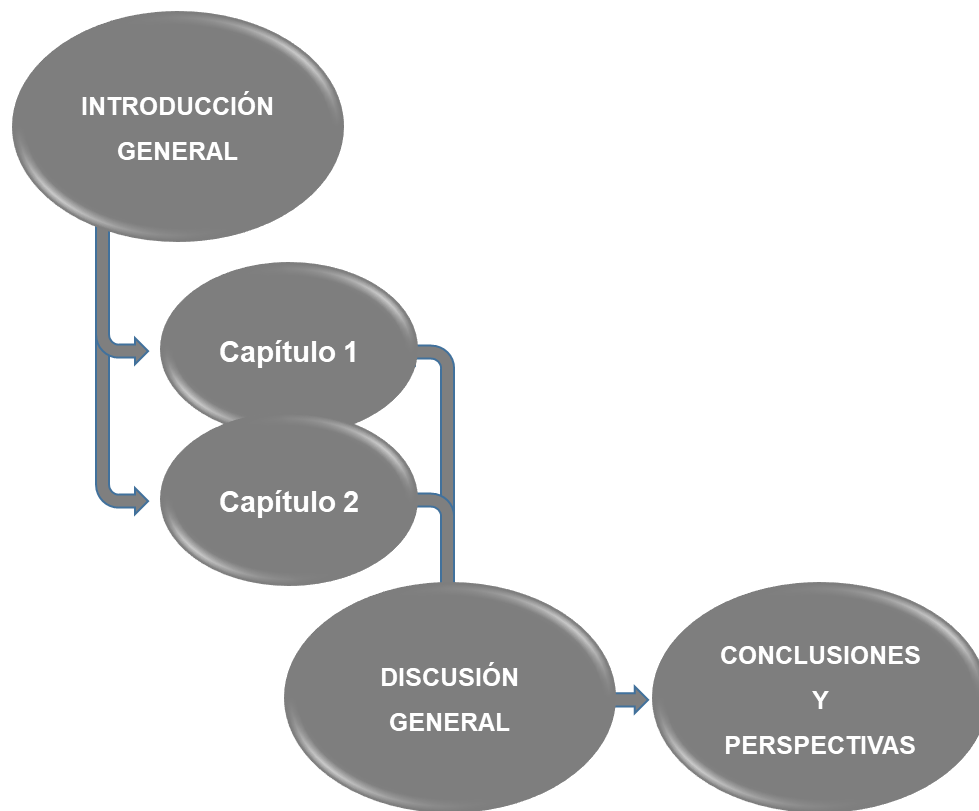
La zona de la cripta más afectada resultó ser la ZAT. Consistente con esto, las células madre intestinales y las células de Paneth permanecen intactas en número y funcionalidad en el RCA.

En el *Capítulo 2*, se estudió el rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 (CLI3s) en TxI, teniendo en cuenta su función en la regulación de la homeostasis intestinal. A partir de biopsias frescas obtenidas durante la endoscopia de seguimiento de los pacientes TxI, en comparación con biopsias de pacientes control (no trasplantados), se aisló y analizó la prevalencia de esta población celular mediante citometría de flujo. Se correlacionaron dichos resultados con la expresión de IL-22, citoquina que media la proliferación y diferenciación celular al unirse a su receptor en las células madre intestinales, en lámina propia y la producción de la misma por parte de los linfocitos T CD4⁺.

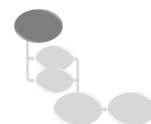
Las CLI3s, no se vieron afectadas por el esquema de inmunosupresión ni por el RCA. Sin embargo, exhibieron un fenotipo inflamatorio que concuerda con la disminución de IL-22 en la lámina propia de pacientes con RCA.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la reparación ineficiente durante el RCA puede deberse, en parte, a la ausencia de IL-22 aún en presencia de células madre intactas. Esto abre una nueva ventana de opción terapéutica diferente al uso de inmunosupresores.

ESQUEMA ORGANIZATIVO DE LA TESIS



Para facilitar la lectura del trabajo de tesis se incluirá este diagrama en el extremo superior derecho de cada página indicando la sección que se está leyendo.



INTRODUCCIÓN GENERAL

Anatomía, histología y fisiología del intestino delgado

I-Generalidades

El aparato digestivo está constituido por dos grupos de órganos: el tracto gastrointestinal y los órganos digestivos accesorios. El tracto gastrointestinal, o tubo digestivo, es un tubo hueco y continuo de 5 metros que se extiende desde la cavidad bucal hasta el ano. En su constitución, de proximal a distal, encontramos la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso (*Figura 1*). Cada región realiza funciones únicas, complementarias y muy bien integradas que, en conjunto, sirven para regular la ingesta, el procesamiento y la absorción de nutrientes, así como también la eliminación de desechos (*Tabla 1*). Los órganos accesorios, tales como las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas, colaboran produciendo y secretando sustancias que son dirigidas al tubo digestivo mediante conductos y participan en la digestión química de los alimentos sin tomar contacto directo con ellos ^[1, 2].

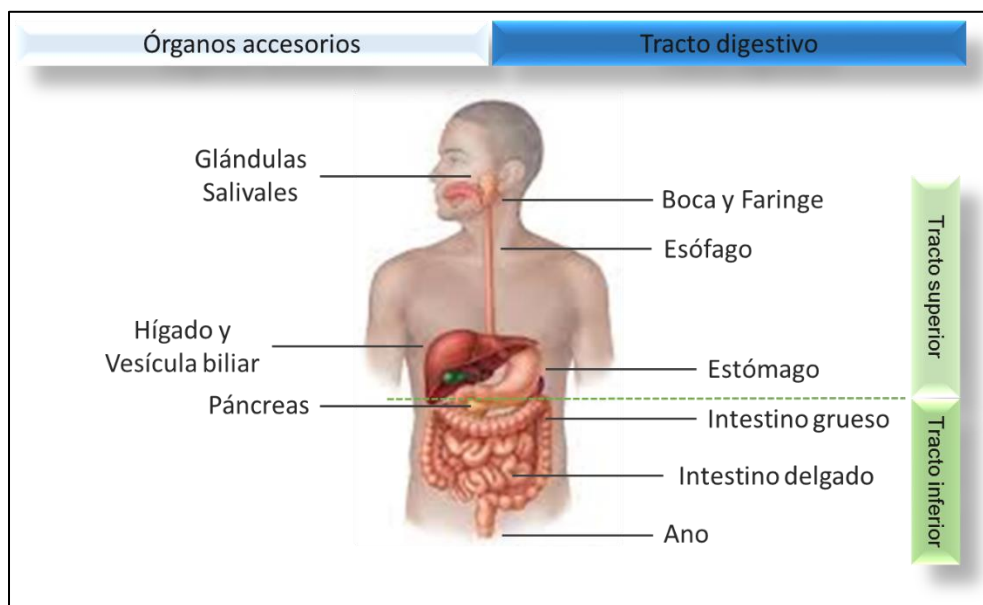
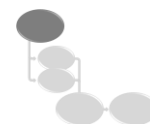


Figura 1: El sistema digestivo y sus constituyentes. Modificado a partir de © 2010 Pearson Education, Inc.

Existen diversas formas de dividir al tubo digestivo. La primera, basada en la fase de desarrollo, lo segmenta en: tracto anterior, medio y superior. No obstante, a los fines de este trabajo, se seleccionó aquella que lo divide en tracto superior e inferior. El límite inequívoco entre dichas regiones es el músculo suspensorio del duodeno o ligamiento de Treitz (primer



segmento del intestino delgado). Los órganos que constituyen cada porción del tracto están indicados en la *Figura 1*.

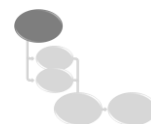
Funciones del Aparato Digestivo	
Ingestión	Entrada y acondicionamiento de los alimentos (sólidos o líquidos).
Secreción	Liberación de agua, ácido, soluciones tampón y enzimas a la luz del tracto.
Mezcla y Propulsión	Contracciones del músculo liso del tracto (peristalsis) que permite la mezcla y avance del bolo alimenticio a lo largo del mismo.
Digestión	Procesos mecánicos y químicos responsables de la conversión de los alimentos en moléculas orgánicas simples.
Absorción	Pasaje de las moléculas resultadas de la digestión desde la luz intestinal al sistema circulatorio o linfático.
Excreción	Eliminación de desechos, sustancias no digeribles, bacterias y células descamadas son eliminadas en forma de heces.

Tabla 1: Descripción de las funciones desarrolladas por el aparato digestivo durante el proceso global de digestión.

II-Anatomía del intestino delgado

El intestino delgado limita, en su extremo distal, con el esfínter pilórico del estómago, se repliega a través de la parte central e inferior de la cavidad abdominal, y finaliza en la válvula íleo-cecal que lo separa del intestino grueso. El mismo se subdivide en 3 regiones:

- ❖ Duodeno: Cuenta con, aproximadamente, 25 cm de longitud en forma de "C", enmarca la cabeza del páncreas. Consta de cuatro segmentos o porciones. La primera, horizontal a continuación del píloro, también llamada bulbo duodenal, la cual hace una deflexión dando lugar a la segunda porción duodenal. Ésta, con sentido vertical, descendente, recibe por la cara interna los conductos de la vía biliar (colédoco) y del páncreas (Wirsung) unidos o por separado de acuerdo a variaciones individuales. Con un nuevo cambio de dirección, recupera la posición horizontal dando inicio a la tercera porción, la cual se continúa finalmente con la cuarta. Ésta última, corre en sentido oblicuo antero posterior, finalizando en el ángulo de Treitz o duodeno-yeyunal que marca el inicio del yeyuno, segmento medio del intestino delgado.



- ❖ Yeyuno: Se extiende a continuación del duodeno y está dispuesto en asas con segmentos de recorrido horizontal, de mayor vascularización a la observación anatómica y con un número superior de arcadas vasculares.
- ❖ Íleon: Porción final del intestino delgado; sus asas toman disposición vertical. Éste está separado del intestino grueso por la válvula ileocecal ^[2, 3]. La longitud media del yeyuno-íleon fue recientemente descrita a partir de un estudio en intestinos de donantes cadavéricos (posreperfusión) resultando de 325 cm como valor medio ^[4].

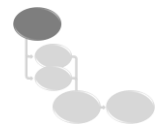
III-Histología del intestino delgado

Los procesos más importantes de digestión y absorción se producen en el intestino delgado, por lo que su estructura está altamente adaptada y especializada para tal función.

Al igual que en el resto del tubo digestivo, la pared intestinal consta de 4 capas concéntricas: 1) mucosa, 2) submucosa, 3) muscular y 4) serosa (desde la cara luminal al límite externo; *Figura 2A*).

1. Mucosa: La mucosa del intestino delgado, junto a la submucosa, presenta adaptaciones estructurales tendientes a mejorar su capacidad absorptiva. Estas consisten en repliegues permanentes perpendiculares al eje del tracto digestivo, llamados *pliegues circulares*, que miden 10 mm y permiten aumentar 600 veces el área superficial del intestino (*Figura 2A*). Además, proyecciones de mucosa de 0,5 a 1 mm forman *vellosidades* que tapizan la superficie luminal (*Figura 2B*). Cada vellosidad está cubierta por una capa de epitelio columnar simple y contiene una red de capilares sanguíneos y linfáticos. Cada célula epitelial en la vellosidad, a su vez, presenta evaginaciones citoplasmáticas en su cara apical llamadas *microvellosidades*, que dan un aspecto de ribete en cepillo al microscopio y aumentan aún más la superficie intestinal (*Figura 2C*). A pesar de que se presentan a lo largo de todo el intestino, tanto pliegues como vellosidades, tienden a disminuir en el íleon dado que la mayor parte de la absorción se da en el duodeno y en el yeyuno. La mucosa está compuesta, a su vez, por el epitelio, la lámina propia y la *muscularis mucosae* (*Figura 2B*):

- Epitelio: Consiste en una capa epitelial cilíndrica simple, que contiene varios tipos celulares. Los mismos pueden clasificarse según su función en absorptivos o secretores. Las células absorptivas, como los enterocitos y las células M, digieren y absorben nutrientes del quimo intestinal y participan en la translocación de antígenos



(Ags) lumbales, respectivamente. Las células caliciformes que secretan moco, las células neuroendócrinas que liberan hormonas y las células de Paneth que producen péptidos antimicrobianos, pertenecen al grupo de células secretoras [5].

El epitelio intestinal presenta un plegamiento particular que da lugar a unidades estructurales (Figura 2B). Cada unidad está formada por la vellosidad, que protruye hacia el lumen y contiene a la mayoría de los tipos celulares antes mencionados, y la cripta de Lieberkühn, una invaginación que constituye la unidad proliferativa y contiene a las células madre intestinales (ISC, del inglés *intestinal stem cells*) y su progenie y a las células de Paneth [6]. Dado que el lumen intestinal constituye un ambiente hostil, las células del epitelio intestinal se encuentran en constante renovación. Este proceso implica un delicado balance entre la división, proliferación y diferenciación de las células madre intestinales y la apoptosis de las células en la punta de la vellosidad [7]. Las células madre en la zona del fondo de la cripta (ZF) se dividen diariamente dando lugar a aproximadamente 15 células [8]. Debido al tamaño restringido de la base de la cripta, sólo la mitad permanecerá allí como ISC. El resto es empujado hacia arriba, donde se producen unos cuantos ciclos de proliferación (zona de amplificación en tránsito –ZAT- de la cripta) hasta que alcanzan la diferenciación y maduración y ascienden a la vellosidad. Este tipo de migración tipo “cinta transportadora” fue descrita en 1971 [9]. Tres días posteriores a alcanzar el fenotipo maduro, las células alcanzan la punta de la vellosidad y son liberadas al lumen.

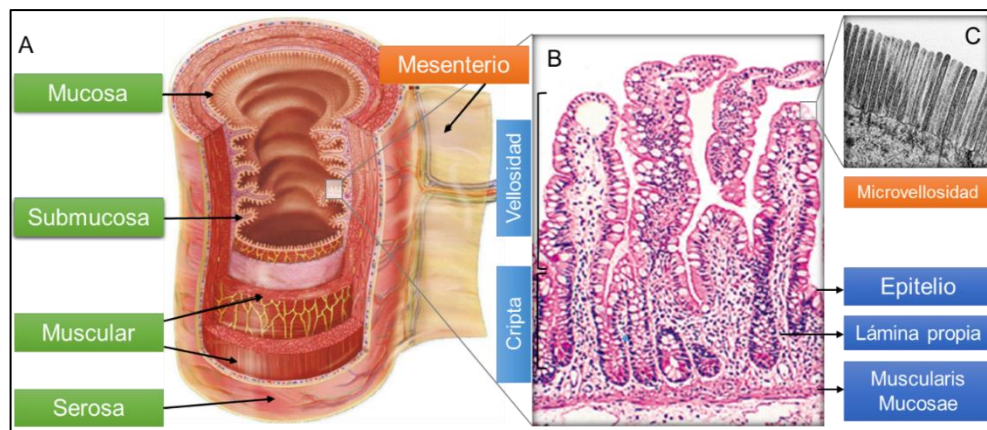
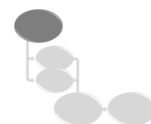


Figura 2: Histología del intestino delgado. A) Capas tisulares que componen al intestino. B) Corte histológico de la mucosa intestinal. C) Microvellosidades. Modificado de Mescher, A. Junqueira's Basic Histology. Text and atlas. 14th edition. Mcgraw-hill, 2013.

- Lámina propia: Está constituida por tejido conectivo areolar y contiene abundante tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Este último concepto será abordado con más detalle en la próxima sección.



- **Muscularis Mucosae**: Fina capa de músculo liso que está en íntimo contacto con la lámina propia.

2. Submucosa: Tejido conectivo grueso que contiene terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos y pequeñas glándulas. En el duodeno, estas glándulas son más abundantes y tienen como función neutralizar el pH ácido del quimo que proviene del estómago.

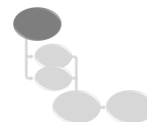
3. Muscular: Está formada por dos capas de músculo liso, la interna con células orientadas circularmente, mientras que la externa lo hacen de forma longitudinal. La capa interna provoca desplazamientos del material que se está digiriendo hacia adelante y hacia atrás, de manera que se mezcle bien con las sustancias digestivas y, también, para que se renueve el líquido en contacto con las células epiteliales. La capa longitudinal, en cambio, produce contracciones en forma de onda que provocan el avance del material en digestión a lo largo del intestino.

4. Serosa: Capa de tejido conectivo que recubre externamente a los órganos del tracto digestivo.

Sistema inmune de la mucosa

El tracto intestinal, con una superficie equivalente a una cancha de tenis *single* en adultos, es la barrera tisular más grande del cuerpo humano y esto lo convierte en el acceso potencial más extenso para todo tipo de patógenos. Sin embargo, en condiciones normales, este pasaje a través de la barrera intestinal no se produce a consecuencia de un evolucionado sistema de defensa capaz de confinar la microbiota mientras permite mantener la función de incorporación de nutrientes. La estrategia es una defensa “en capas” conformada por una capa mucosa estratificada que cuenta con un epitelio relativamente impenetrable pero de alta capacidad de respuesta y una lámina propia poblada por células del sistema inmune innato y adaptativo que participan activamente en respuestas homeostáticas. Éstas tienen como finalidad contener a la microbiota sin una inflamación excesiva, incluso siendo capaces de inducir respuestas antimicrobianas en caso de disrupción de la barrera ^[10].

Las células del sistema inmune pueden hallarse dispersas en la lámina propia o en estructuras organizadas (*Figura 3*). Estas últimas comprenden el sistema inmune de la mucosa (MALT, *del inglés Mucosa- Associated Lymphoid Tissue*) que, en el caso particular del intestino, se denomina GALT (*del inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue*) ^[11, 12].



I-GALT: Sitios inductores

El tejido linfoide asociado al intestino está compuesto por los folículos linfoides aislados (FLA), las Placas de Peyer y los criptoparches:

- **Folículos linfoides aislados (FLA):** Consisten en agregados linfoides mayoritariamente de linfocitos B (LB), que se hayan dispersos en la mucosa y se hacen más numerosos en íleon distal ^[13]. También contienen células dendríticas (CDs) y células linfoides innatas (CLIs). Presentan un centro germinal (CG), es decir células B capaces de realizar el cambio de clase de inmunoglobulina M (IgM) a inmunoglobulina A (IgA) y esto indica la madurez del FLA. Estos agregados están cubiertos por una capa epitelial especial denominada “epitelio asociado a folículo” (EAF), la cual consiste en un epitelio cúbico simple, cuya característica principal es la presencia de las células M ^[14]. Éstas no contienen microvellosidades, sino microplegamientos en su cara apical (por lo que, al microscopio pierden el llamado “borde cepillo”), lo que le permite transportar por trancitosis activa antígenos luminales hacia la lámina propia ^[15]. En su cara basal, posee una cavidad donde se asocian a ella células del FLA como CDs, células T (LT) CD4⁺ y LB. La función principal de los folículos es la producción local de IgA antígeno específica ^[16]. También, se ha visto que puede actuar como sitio inductivo de respuestas a ciertos patógenos en ratón^[17].

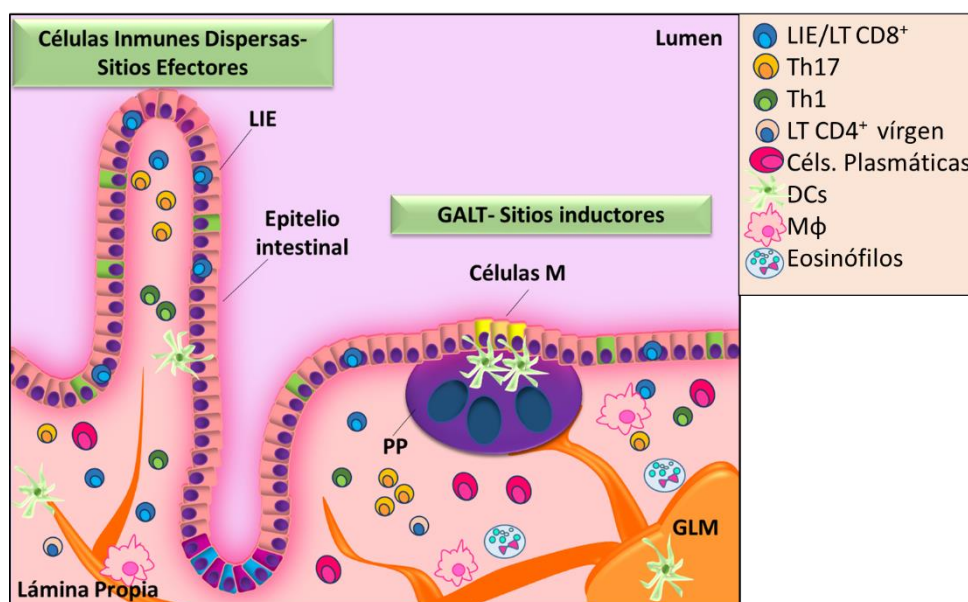
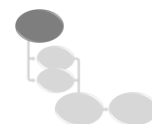


Figura 3: El sistema inmune intestinal. Representación del sistema inmune intestinal que muestra a las células dispersas en lámina propia y epitelio (sitios efectores) y a las estructuras celulares organizadas del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal (GALT, del inglés Gut associated lymphoid tissue). PP, placa de Peyer; GLM, ganglio linfático mesentérico; LIE, linfocitos intraepiteliales; LT, linfocito T; Th, linfocito CD4⁺; DCs, células dendríticas; Mφ, macrófago.



- **Placas de Peyer (PP):** Las PP son agrupaciones de cúmulos linfoides (alrededor de 5 en ratón, mientras que en humanos puede alcanzar los 10) ^[18] que presentan entre ellos zonas de células T denominadas "T interfoliculares". Son más abundantes en la zona distal del Íleon. Cada cúmulo individual es semejante al FLA.
- **Criptoparches:** Consisten en pequeñas áreas organizadas de tejido linfóide encontradas en la pared intestinal. Los mismos contienen células dendríticas y células inductoras de tejido linfóide por lo que se estima que son formas inmaduras de los FLAs ^[13, 19].

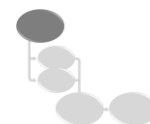
Si bien trabajos recientes no los consideran parte de GALT por no captar antígenos directamente desde el lumen intestinal, se incluyó a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) en esta sección dado que son actores importantes de la respuesta inmune en la mucosa.

- **Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM):** Los GLM poseen una cápsula de tejido fibroso y por debajo de ella se encuentra la corteza ^[20]. La parte más externa de la misma se halla poblada principalmente de células B ^[21]. Las mismas están organizadas a modo de folículos. Si éstos poseen un CG, se los denomina folículos secundarios mientras que si no lo poseen primarios y se constituyen con linfocitos B maduros vírgenes. Mientras que en la parte más profunda de la corteza se encuentran los LT. Luego, encontramos la médula del ganglio con células linfoides dispuestas de manera más dispersa y con fagocitos entre los sinusoides linfáticos y los capilares sanguíneos. Entre la corteza y la cápsula, circula la linfa que luego baña la corteza, la médula y drena por un solo vaso eferente. El intestino no drena en un solo GLM, sino que cada porción del intestino lo hace en uno diferente ^[22, 23]. Las CDs pueden viajar a través de los vasos linfáticos aferentes y presentar los antígenos que transportan a las células del GLM, dando lugar a una respuesta en la mucosa o sistémica ^[24].

II-Células efectoras de la mucosa intestinal

La porción difusa del sistema inmune intestinal comprende gran variedad de células que se distribuyen principalmente en la lámina propia y en el epitelio intestinal, considerándose a éstos como sitios efectores.

En la *lámina propia*, las células varían en cantidad y subtipo a lo largo del intestino debido a que se ha demostrado que la dieta y la presencia de microorganismos tienen alta incidencia sobre el sistema inmune intestinal. La abundancia relativa de cada una de ellas se muestra en la *Figura 4*. Dentro de los subtipos linfoides podemos encontrar:



- Linfocitos T:** Éstos se presentan en la mucosa intestinal del íleon y el colon en un número 5-8 veces mayor que los linfocitos B. En yeyuno, dicho número puede ser hasta 20 veces superior [25]. Los mismos derivan de linfocitos T convencionales que han tomado contacto con antígenos en órganos linfoides secundarios; por lo que, más del 90% de ellos presentan el fenotipo típico de las células de memoria efectoras (CCR7⁻ CD45RO⁺). Porcentajes similares fueron observados tanto en individuos jóvenes como adultos, a diferencia de otros tejidos como los nódulos linfáticos donde esta proporción aumenta con el paso del tiempo. También expresan el marcador de activación CD69, lo cual los identifica como células residentes. Tanto linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ están presentes en una relación de 2:1 aproximadamente [25]. Mientras que la subpoblación CD8⁺ es limitada a aquellos linfocitos que secretan IFN γ , la subpoblación CD4⁺ presenta gran diversidad. Comprende linfocitos secretores de IL-2 e IFN γ (perfil Th1), individualmente o combinados, en mucha menor frecuencia células Th2 (productoras de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), aquellos que producen IL-17 o IL-22 (Th17 o Th22) [26] y también a las células FOXP3⁺ que secretan IL-10 y son denominadas reguladoras (Treg) [27, 28]. La distribución y función de las mismas cambia a lo largo del intestino, en gran medida debido al diferente contenido luminal. Ha sido reportado que existe un número elevado de linfocitos CD4⁺ productores de IL-17 en íleon y colon, siendo éste notablemente mayor que en íleon [25]. Otros estudios aportan evidencia de que en el ciego (primera porción del intestino grueso) las células Th17, Th22 Treg se hallan más representadas que en íleon y en porciones más distales del intestino grueso [28]. No obstante, las frecuencias de células Th1 y Th2 se mantendrían constantes.

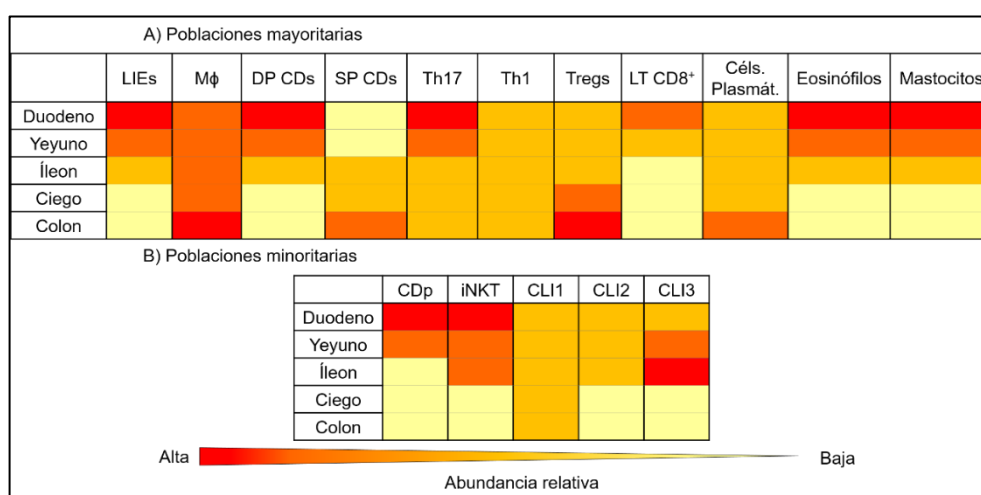
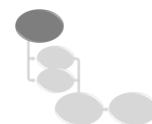


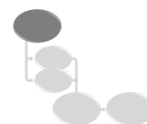
Figura 4: Abundancia relativa de las distintas poblaciones celulares del sistema inmune en el intestino. Se indica mediante código de colores la abundancia de los diversos tipos celulares que pueblan cada una de las diferentes secciones en la que se divide el intestino. El código va desde el color rojo, que indica un número alto de células en dicha sección, al amarillo que implica una escasa cantidad de la población en cuestión. A) Poblaciones con mayor representación. B) Poblaciones de menor número. LIEs, linfocitos intrepiteliales; M ϕ , macrófagos; DP CDs, células dendríticas doble positivas; SP CDs, células dendríticas simple positivo; Th, linfocitos CD4⁺; Tregs, células T reguladoras; LT, linfocito T; CDp, células dendríticas plasmocitoides; iNKT, células T Natural Killer invariantes; CLI, células linfoides innatas.



- **Células T invariantes:** De un modo menos frecuente, es posible localizar en la lámina propia intestinal células que poseen una versión invariante del receptor de células T (RCT). En concordancia con ello, tienen funciones durante la respuesta inmune innata. Dentro de este grupo se incluyen a las células invariantes asociada a mucosa (CIAM; $CD3^+CD161^{hi}CD8\alpha\alpha^+$ (o $CD4^-CD8^-$)) y a las células T Natural Killer invariantes (iNKT) [29].
- **Linfocitos B:** A diferencia de la mayoría de los tejidos sanos, el tracto intestinal presenta abundante cantidad de linfocitos B [30]. Mientras los que se hallan en los sitios inductores son linfocitos vírgenes a la espera de tomar contacto con algún antígeno; en lámina propia, los linfocitos B efectores o de memoria sufren la diferenciación terminal a células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A (IgA) [31]. La IgA resulta de vital importancia, dado que constituye una de las primeras líneas de defensa de la barrera intestinal neutralizando patógenos y toxinas y evitando la adhesión de bacterias comensales al epitelio [32]. En humanos, no así en ratón, hay dos subtipos de IgA [32, 33]. La IgA1, que predomina en duodeno y yeyuno y, la IgA2 que es dominante en la porción distal del intestino donde la microbiota es más abundante. Probablemente esta distribución diferencial esté asociada a la mayor estabilidad ante proteasas bacterianas de la IgA2 [34].
- **Células linfoides innatas (CLI):** Estas células tienen morfología linfoide y se asemejan, en cuanto a inducción, activación y producción de citoquinas, a los linfocitos T colaboradores. Sin embargo, no poseen receptores de rearreglo de antígenos, por lo que, actúan de forma no específica y temprana. Existen distintas subpoblaciones de CLIs llamadas CLIs de Grupo 1, 2 y 3 y dicha clasificación está basada en la expresión diferencial de marcadores de superficie y factores de transcripción así como también en la secreción de citoquinas [35].

Las *CLIs de Grupo 1 (CL1)* responden y se activan ante la presencia de IL-12, expresan constitutivamente T-bet y secretan interferón- γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral (FNT) [36]. Publicaciones recientes le confieren a esta subpoblación un rol crucial en la defensa contra patógenos intracelulares. En estudios en ratones, estas constituyen la mayor fuente de IFN γ y FNT ante la infección con *Toxoplasma gondii* [36] y *Salmonella entérica* [37]. No obstante, también fueron asociadas a la Enfermedad de Crohn en humanos [38]. Esta es una patología inflamatoria intestinal crónica caracterizada por un exceso de IFN en la lámina propia.

El grupo 2 (CL2), por su parte, es sensible a inducción a través de IL-25, IL-33 y linfopoyetina del estroma del timo (LPET) [39]. Expresa constitutivamente el factor de transcripción GATA3, que es necesario no sólo para su inducción sino también para su



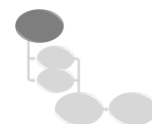
mantenimiento y función tanto en humanos como ratones, y secreta IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y ampiregulina ^[35]. Estas citoquinas del perfil inflamatorio tipo 2 activan macrófagos, inducen la respuesta de granulocitos, producen la hiperplasia de las células de Goblet productoras de mucina y la contracción de músculo liso convirtiendo a las CLI2 en actores fundamentales de la expulsión de parásitos helmintos extracelulares como *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichuris muris* ^[40, 41].

Por último, *las células linfoides innatas del grupo 3 (CLI3)* se definen en base a la expresión del factor de transcripción ROR γ t (receptor gamma relacionado al receptor de ácido retinoico) ^[42] y del marcador de superficie c-kit (CD117) ^[43]. Ellas responden a la inducción con IL-23 e IL-1 β con la secreción de citoquinas Th17/Th22: IL-17A, IL-17F e IL-22. Dentro de este grupo se incluye a las células inductoras de tejido linfóide (ITL) fetales ^[44], que participan en la generación de tejido linfóide durante la embriogénesis, y a las CLI3 posnatales. Éstas últimas se subdividen en base a la expresión del receptor de activación de células NK, NKp44, en NCR⁺ CLI3 - que secretan IL-22 pero no IL-17 - y NCR⁻ CLI3 que secretan IL-17 mayoritariamente.

Esta nueva población de células inmunes innatas será abordada con profundidad en el Capítulo 2.

Las células no linfoides, por su parte, son:

- **Macrófagos (M ϕ):** Constituyen los leucocitos más abundantes en la lámina propia intestinal en condiciones normales ^[45] y cumplen con importantes funciones para el mantenimiento de la homeostasis ^[46]. Entre ellas se puede mencionar la fagocitosis y degradación de microorganismos y células muertas ^[47] y, también, la producción de mediadores que inducen la regeneración epitelial ^[48]. Además, bloquean las respuestas pro-inflamatorias consecuencia de la estimulación de los receptores tipo Toll (RTT) ^[49] y promueve la función y el mantenimiento de las células Treg ^[50] mediante la producción de abundante IL-10.
- **Células dendríticas (CD):** Éstas pueden hallarse no sólo dispersas en lámina propia, sino también en las estructuras organizadas del GALT ^[24]. Las mismas son células presentadoras de antígeno (CPA) y, a su vez, son capaces de polarizar la respuesta Th mediante moléculas solubles o unidas a membrana tales como (IL)-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, FCT β , IFN α , ligando OX40 (OX40L) y ácido retinoico ^[51]. Si bien la mayoría de los estudios sobre este tipo celular fueron realizados en ratón, recientemente un estudio comparativo en humanos estableció la existencia de 4 subpoblaciones en la lámina propia a partir de las denominadas CD convencionales (CDc), CD45⁺ Lin⁻ CMHII⁺ CD11c⁺

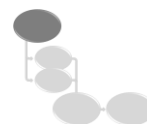


CD123⁻, en base a la expresión de la integrina CD103 y de Sirpα (CD172a, receptor de CD47) [52]. La población doble positiva (DP CDs, CD103⁺ Sirpα⁺) induce la producción de células Tregs. Mientras que las células CD103⁺ (DP CDs y SP CDs (CD103⁺ Sirpα⁻)) polarizan la respuesta T hacia un perfil Th17, las CDs CD103⁻ Sirpα⁻ lo hacen hacia un perfil Th1. La población doble negativa, resultó insignificante en número y no fue estudiada en profundidad.

Existe una subpoblación de CDs denominada *CDs plasmocitoides (CDp)*. Estas deben su nombre a su semejanza con las células plasmáticas y a la expresión de B220. Se encuentran en menor proporción que las CD convencionales y están restringidas a intestino delgado [53]. Las mismas producen IFNγ en respuesta a infecciones virales o a la activación de receptores tipo Toll [54] y presentan casi nula actividad presentadora de antígenos [55]. También fue hallada dicha población en LP humana [52].

- **Eosinófilos:** Los mismos están presentes en intestino fetal y en ratones libres de gérmenes [56]. Debido a esto, se considera que tienen funciones importantes tanto en condiciones normales como durante procesos inflamatorios. Estudios recientes le atribuyen funciones en el proceso de conmutación del tipo de inmunoglobulinas en las PPs y el mantenimiento del número de células plasmáticas productoras de IgA, CDs y Tregs [57].
- **Mastocitos:** Estas células producen moléculas que regulan la integridad de la barrera epitelial, la peristalsis y el tono y la permeabilidad vascular. Interaccionan, a su vez, con el sistema nervioso local y pueden detectar microorganismos a través de los receptores tipo Toll [58, 59]. El número de las mismas disminuye desde íleon al recto [60] y sus funciones varían de acuerdo a la posición a lo largo del intestino. Mientras en el intestino delgado los mastocitos producen una proteasa dependiente del FNTβ involucrada en el remodelado del tejido [61], en colon predomina una población de perfil pro-inflamatorio [62].

El *epitelio intestinal* contiene numerosos linfocitos T que se localizan en la membrana basal entre los enterocitos, denominados por esta razón como linfocitos intraepiteliales (LIE; *Figura 3*). La representación de los mismos en cada sección del intestino se hallan ilustradas en la *Figura 4*. Los mismos son altamente heterogéneos y protegen al epitelio en respuesta a los antígenos asociados a estrés por la presencia de patógenos o a los antígenos propios del patógeno, así como también frente a la injuria por inflamación producida por leucocitos que infiltran la mucosa. No obstante, en casos extremos, pueden producir injuria epitelial por lo que su regulación es muy importante [63]. Si bien la mayoría de las células que pueblan el epitelio son linfocitos T, en trabajos publicados en los últimos años se ha observado la



presencia de una subpoblación de LIE que no expresa en su superficie el marcador de células T CD3 (CD3⁻ LIE). Las mismas fueron estudiadas en profundidad determinando que tienen el perfil de las células NK, ILC1 e ILC3; las dos primeras con funciones citotóxicas mientras que las últimas tendrían un rol tolerogénico [64].

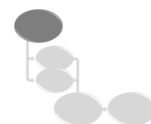
Inmunología asociada al trasplante

I-Bases de la aloinmunidad

La capacidad del sistema inmune de distinguir entre “lo propio” y “lo no propio” define su función principal de proteger al organismo contra diferentes patógenos evitando respuestas autoinmunes [65]. Ahora bien, ¿qué sucede si “lo no propio” presente en un organismo es un conjunto de células, un tejido o un órgano completo que fue implantado para sustituir a uno propio no funcional? El establecimiento del trasplante como opción terapéutica fue el resultado conjunto del avance propio del método quirúrgico y de numerosas contribuciones en el campo de la inmunología tendientes a evitar o aminorar la alorespuesta [66]. Sin el desarrollo del conocimiento inmunológico, el trasplante hubiese quedado en la simple anécdota de un desarrollo quirúrgico inviable.

Los primeros grandes avances en el conocimiento de la inmunología asociada al trasplante fueron atribuidos al zoólogo Peter Medawar y le valieron un premio Nobel en 1960 [67]. Sus experimentos iniciales estaban enfocados en injertos de piel en pacientes quemados durante la II Guerra Mundial [68] y fueron profundizados posteriormente en estudios con conejos y ganado [69-71]. En ellos observó, en concordancia con estudios previos de otros científicos [72, 73], que los autoinjertos así como también los injertos singénicos (entre individuos endocriados o gemelos) de piel son exitosos mientras que los realizados entre individuos con diversidad genética (homoinjertos en aquella época, hoy conocidos como aloinjertos) no. En estos últimos, se desarrollaba una respuesta por parte del sistema inmune adquirido caracterizada por la infiltración de leucocitos, consecuencia de la cual se producía el deterioro del injerto a los 12 días. Además, si se realizaba un segundo injerto de piel del mismo donante sobre un conejo previamente injertado, la segunda respuesta era aún más rápida [68-70, 74].

En el año 1954, se realiza el primer trasplante exitoso en humanos [75]. El mismo se trató de un trasplante de riñón en el cual la pareja donante-receptor eran gemelos y fue llevado a cabo por el Dr. Joseph Murray.



Si bien fueron muchos los avances en el campo, el entendimiento del mecanismo por cual se desarrollaba esa respuesta inmune fue por muchos años desconocido.

El descubrimiento de que los linfocitos T sólo se activan en presencia de antígenos presentados en el contexto de una serie de moléculas altamente variables que se expresan en la superficie de todas las células ^[76-79] fue la clave para comenzar a comprender dicho fenómeno. Estas moléculas se originan a partir de un grupo de genes denominado *Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)* que fue definido en primera instancia en ratón ^[80] y, posteriormente, en humanos ^[81].

El CMH humano esta codificado en el brazo corto del cromosoma 6 y se extiende aproximadamente 4 millones de pares de bases (aunque este límite es difícil de establecer dado que continuamente se están encontrando nuevos genes) ^[82]. La organización del mismo se muestra en la *Figura 5A*.

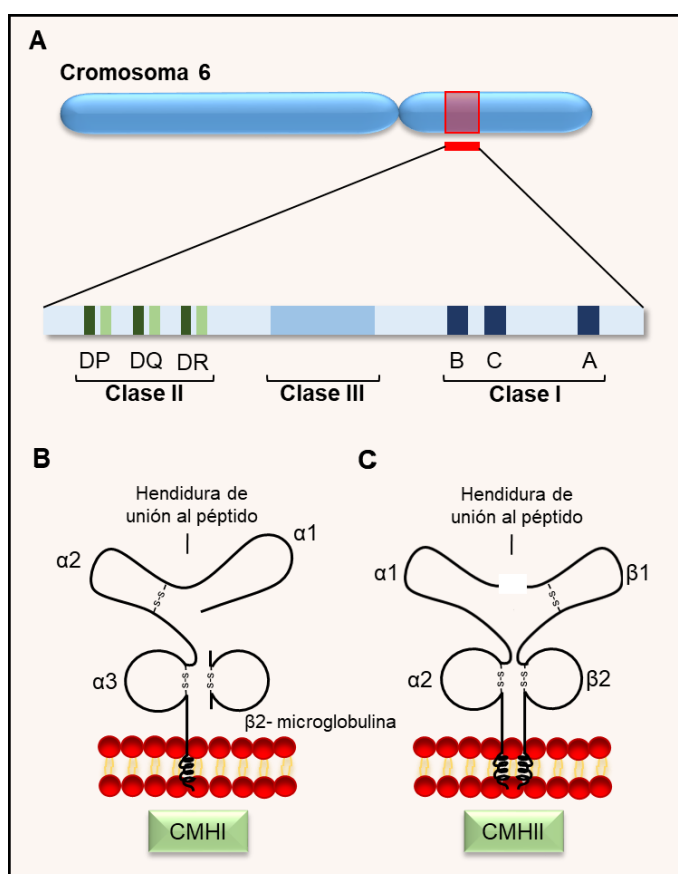
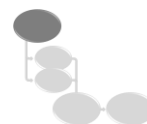


Figura 5: Complejo mayor de histocompatibilidad humano (CMH). A) Organización del locus del CMH en el cromosoma 6. B) Molécula del CMH de Clase I (CMHI). C) Molécula del CMH de Clase II (CMHII).

El CMH tiene dos características principales ^[65]:



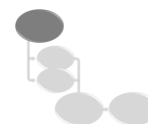
- ❖ Poligénico: Contiene varios genes para sus dos tipos de moléculas (clase I y clase II).
- ❖ Polimórfico: Existen en la población múltiples variantes o alelos para cada gen.

Esto permite que cada individuo posea una combinación única de estas moléculas, llamadas HLA (del inglés, *human leukocyte antigen*), y el CMH se convierta en una especie de “huella digital” molecular.

Los genes del CMH dan lugar a dos tipos de moléculas implicadas en la presentación antigénica: Clase I y Clase II (*Figura 5B-C*)^[81]. Ambas son glicoproteínas de membrana y si bien tienen una estructura global similar difieren en la composición peptídica^[83, 84] así como, también, en el patrón de distribución en los tejidos^[85] y el tipo de linfocito T al cual presenta antígenos^[86, 87] (*Tabla 2*). La característica estructural compartida, y de fundamental importancia, es la presencia de una hendidura o bolsillo donde se alojan los péptidos a presentar.

1. Moléculas de Clase I (CMHI; Clásicas: HLA-A, HLA-B, HLA-C): Están constituidas por dos cadenas polipeptídicas^[65]. Una de ellas, la cadena α (43 kDa), posee tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). $\alpha 1$ y $\alpha 2$, son los dominios que conforman la hendidura antes mencionada mediante un plegamiento particular formado por dos hélices α apoyadas sobre una lámina β antiparalela de 8 hebras^[88]. Por lo que, es en la secuencia de los mismos donde se encuentra la mayor variabilidad. El dominio $\alpha 3$, es el más cercano a membrana y está asociado mediante uniones no covalentes a la segunda cadena polipeptídica: la β_2 -microglobulina (12 kDa). Esta última está codificada en el cromosoma 15 en humanos y no es polimórfica^[89]. Tanto $\alpha 3$ como la β_2 -microglobulina presentan un plegamiento de tipo dominio de Ig (*Figura 5B*)^[88, 89].

Existe otro grupo de moléculas de Clase I denominadas “no clásicas”. HLA-E, HLA-F y HLA-G presentan estructuras similares a su contraparte “clásica”, una cadena pesada de varios dominios en asociación con la β_2 -microglobulina. La diferencia fundamental reside en que posee un surco de unión a péptido altamente conservado^[90]. Es de especial interés para este trabajo la HLA-G, también llamada inmunosupresora o tolerogénica. La misma se encuentra expresada en las células del citotrofoblasto y su interacción con los receptores inhibidores de las células NKs y LTs limita la acción citotóxica de las mismas^[91]. Esta función es de vital importancia para la tolerancia materna de un feto genéticamente diferente. Estas células no se expresan en todos los tejidos, pero si se han encontrado en la superficie de células tumorales o infectadas como mecanismo de evasión al sistema inmune. En el campo del trasplante, la alta expresión de HLA-G se ha correlacionado con mejores resultados en



trasplante de corazón, riñón y células hematopoyéticas [92] [93]. Aún no hay evidencia de su presencia y/o función en intestino.

2. Moléculas de Clase II (CMHII; HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR): Están constituidas por dos cadenas polipépticas (α - 23 kDA y β - 19 kDA) que interactúan entre sí de forma no covalente y están ancladas a membrana [83]. Cada una de ellas posee dos dominios: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y $\beta 1$ - $\beta 2$. Mientras que $\alpha 2$ y $\beta 2$ están cercanos a membrana y se pliegan de forma similar a un dominio Ig, $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman la hendidura de unión al péptido. Del mismo modo que en el CMHI, ésta última constituye la región más polimórfica de la molécula. Dado que la hendidura está formada por dos cadenas polipeptídicas, la misma posee los extremos abiertos a diferencia de las CMHI donde está completamente cerrado [94]. Esta característica implica que a la hendidura de las CMHII puedan unirse péptidos más grandes (Figura 5C) [95].

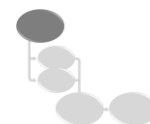
Moléculas	Péptido (AA)	Expresión	Presentación
Clase I	8-10	Células nucleadas	LT CD8 ⁺
Clase II	11-13 (o más)	CDs, M ϕ y LB	LT CD4 ⁺

Tabla 2: Características de las moléculas del CMH. AA, aminoácidos; CDs, células dendríticas; M ϕ , macrófagos; LB, linfocito B; LT, linfocito T.

La Figura 5A muestra que hay un tercer grupo de genes dentro del CMH, estos codifican para ciertas citoquinas y proteínas del complemento por lo que no será abordado en profundidad [82].

Como se ha mencionado anteriormente, las CMH tienen como función principal la presentación antigénica a los linfocitos T [79]. En el contexto del trasplante, esto se denomina aloreconocimiento y puede producirse por tres vías (Figura 6):

- **Vía directa:** Una célula del donante (principalmente CPAs) directamente activa a los linfocitos T del receptor interactuando con el RCT [96].
- **Vía indirecta:** Una CPA del receptor incorpora, procesa y presenta a los LT un péptido antigénico del donante [96].
- **Vía Semidirecta:** En esta vía recientemente descrita, una CPA del receptor expone en su superficie complejos intactos del CMH- péptido del donante así como, también, péptidos alogénicos en el contexto de sus propias moléculas del CMH [97].



En casos de trasplantes entre gemelos, a pesar de poseer idénticas moléculas del CMH, es posible evidenciar una alorespuesta. La misma es más lenta y se produce en consecuencia del reconocimiento de péptidos provenientes de otras proteínas polimórficas llamados *Antígenos menores de histocompatibilidad* (AMH) ^[98] presentados en el contexto de las MHC del receptor. Algunos de ellos, por ejemplo, provienen de proteínas codificadas en el cromosoma Y ^[99]. Las mismas pueden dar lugar a respuestas en receptores mujeres. No hay demasiada evidencia de la incidencia de estos AMH en el trasplante de órganos sólidos ^[100], debido a la baja cantidad de trasplantes entre individuos genéticamente idénticos.

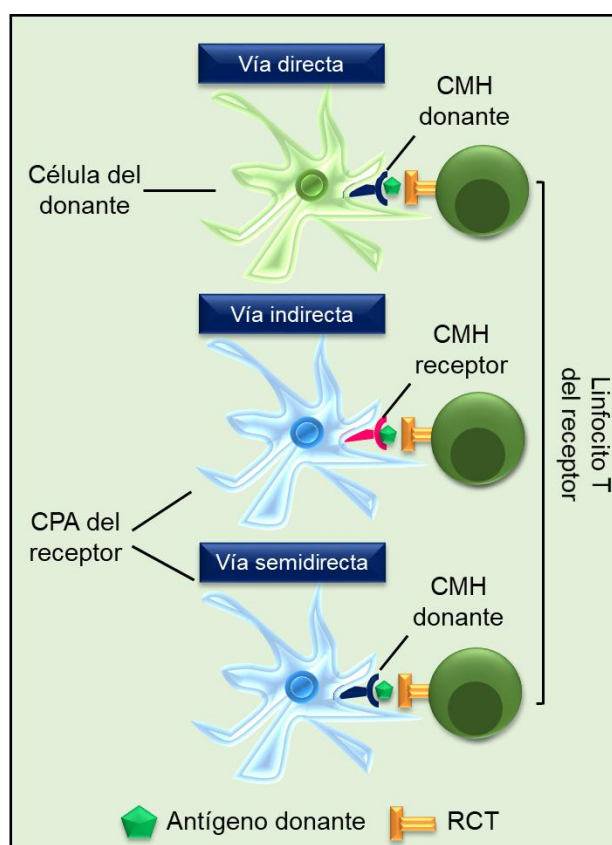
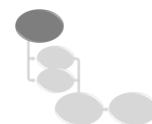


Figura 6: Vías de aloreconocimiento. CPA, células presentadoras de antígeno; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; RCT, receptor de célula T.

Por otro lado, el sistema inmune humoral también presenta una barrera para el trasplante de órganos debido al aloreconocimiento de proteínas y carbohidratos no propios expresados en los injertos por parte de los anticuerpos ^[101]. Este reconocimiento da lugar a una respuesta inmune causando, en última instancia, la pérdida del injerto (se profundizará en la sección de Rechazo de injerto) ^[102]. Históricamente la presencia de *anticuerpos específicos contra el donante* (AED) era una contraindicación para el trasplante; sin embargo, recientes avances en los test para identificarlos y las terapias inmunosupresoras permitieron realizar trasplantes



exitosos a pesar de ellos. Hay dos grupos de antígenos contra los cuales se generan anticuerpos ^[101]:

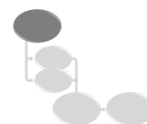
- Antígenos HLA: Los anticuerpos anti-HLA se producen por una vía LT-dependiente. Un LB toma y procesa el antígeno del CMH y lo presenta en su superficie en el contexto de las CMH propias. Posteriormente, requiere la interacción con el receptor de un LT colaborador para madurar a célula plasmática. En este caso, se requiere un contacto previo con el antígeno.
- Antígenos de grupo ABO y xenoantígenos: Estos antígenos son carbohidratos que no requieren una presentación previa ni la colaboración de un LT. Activan las células B por entrecruzamiento con la inmunoglobulina de superficie.

Los AED pueden estar preformados antes del trasplante (como es el caso de pacientes transfundidos o mujeres multíparas) o generarse en el transcurso del postrasplante. Estos últimos son denominados AED *de novo* ^[103].

II-Estudios de histocompatibilidad

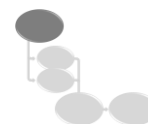
Habiéndose detectado el causal de la reacción inmunológica durante trasplante de aloinjertos, el próximo paso fue predecir o determinar si el trasplante de tejidos podía ser exitoso en una dada dupla donante-receptor. Para lo cual, se desarrollaron diferentes estudios de histocompatibilidad que mostraran no sólo si existía una reacción frente a las moléculas HLA del donante, sino también si el receptor contenía AED preformados.

1. **Determinación del Grupo ABO**: Mediante un ensayo rutinario y simple de aglutinación con hemáties comerciales tipificados como A y B y la sangre, se puede obtener tanto el grupo ABO del donante como del receptor ^[104]. En la *Tabla 3* se muestran las parejas donante-receptor ABO compatibles. No obstante, con el advenimiento de mejoras en las terapias inmunosupresoras y otros pretratamientos, como la plasmaféresis (donde se elimina el plasma de la sangre que es donde se encuentran los anticuerpos), se han podido realizar trasplantes renales entre parejas ABO incompatibles con resultados similares a las ABO compatibles ^[105]. Esto permite, agrandar el pool de donantes posibles para un receptor, disminuir el tiempo en lista de espera y la mortalidad asociada. Sin embargo, requieren de un seguimiento postrasplante más exhaustivo ^[106].
2. **Tipificación de HLA**: Como se ha mencionado en sesiones anteriores, el reconocimiento de las moléculas HLA no propio por parte de los linfocitos T del receptor es uno de los



eventos más importantes para el desarrollo de la alorespuesta ^[79]. Las técnicas de tipificación resultan de utilidad para predecir las posibilidades de aloreconocimiento en base a cuánto difieren las moléculas del CMH del donante y del receptor.

- Tipificación serológica: Se realiza exponiendo a los linfocitos del receptor a varios sueros con un amplio rango de anticuerpos anti-HLA de especificidad conocida ^[107]. Se incuban con complemento y colorante vital. Cuando un anticuerpo reconoce a una molécula del CMH se deposita complemento y, después de ciertos eventos, se produce la muerte de la célula por lo cual el colorante vital puede ingresar. A esta técnica se la denomina “*Citotoxicidad dependiente de complemento*” (CDC) ^[108]. Una técnica similar, produce la lisis de las células mediante el reconocimiento de la porción Fc del anticuerpo unido por los receptores de Fc en células NK o Mφ y es denominada “*Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo*” (CCDA). De esta manera, tomando en cuenta con qué suero se produce reacción, se va identificando a grandes rasgos las moléculas del CMH de la célula. Antiguamente, los laboratorios tenían una seroteca obtenida de mujeres multíparas para realizar estos ensayos. Actualmente, existen placas comerciales de varios pocillos donde cada uno contiene anticuerpos de una especificidad diferente. Tienen la ventaja de que son muy rápidos, pero se requiere buena cantidad de suero para que se pueda obtener un resultado confiable.
- Tipificación molecular: Con la secuencia del CMH perfectamente conocida ^[109], se produjo el advenimiento de las técnicas de tipificación molecular. Las mismas demandan más tiempo que las técnicas serológicas pero pueden llegar a encontrar diferencias de un nucleótido entre las moléculas, por lo que, proveen una mejor cuantificación del riesgo asociado al emparejamiento donante-receptor ^[110] ^[111]. Una de las técnicas empleadas se llama *Reacción en cadena de la polimerasa asociada a cebadores específicos para una secuencia (PCR-PES)* ^[112]. El ADN (ácido desoxirribonucleico) a analizar se coloca en pocillos con cebadores específicos para un dado alelo. La amplificación determina la presencia de dicho alelo en el ADN analizado. Los productos de amplificación se corren y observan en un gel de agarosa. Una segunda metodología, denominada *Sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia* (SOES) consiste, como su nombre lo indica, en el uso de sondas específicas para un dado alelo ^[113]. Las mismas tienen conjugada una molécula fluorescente que luego es detectada. La presencia de fluorescencia es señal inequívoca de que la sonda se pudo hibridar a la secuencia analizada y, por ende, dicho alelo está presente.



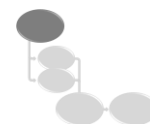
Por último, y más utilizada en la actualidad, se encuentra la *Secuenciación* ^[114]. La misma identifica cada nucleótido en el orden en que aparece en la secuencia. Esta información, es luego comparada con base de datos de alelos de CMH que ya fueron identificados.

- 3. Detección de anticuerpos anti-HLA:** La detección de aloanticuerpos es muy importante para evitar reacciones inmunológicas hiperagudas ^[115] (es decir, al momento de que el injerto toma contacto con la sangre del receptor) y, también, reacciones a largo plazo causando en última instancia la pérdida del injerto ^[116]. Una vez que se conoce que hay un título alto, se pueden tomar medidas tendientes a desensibilizar a estos pacientes para que, igualmente, puedan acceder a la opción del trasplante. Existen dos tipo de técnicas para detectarlos ^[117]:

		Receptor			
		0	A	B	AB**
Donante	Grupos				
	0*	•	•	•	•
	A		•		•
	B			•	•
	AB				•

Tabla 3: Compatibilidad grupo ABO. Se indican con puntos las parejas donante-receptor compatibles. *, donante universal; **, receptor universal.

- Detección de anticuerpos por el método de citotoxicidad celular: Este método es similar al mencionado en tipificación serológica del HLA, pero en este caso son linfocitos de 20 a 40 donantes con diferentes moléculas de HLA que se colocan en los diferentes pocillos de una placa y se incuban con el suero del receptor ^[118]. Cuando el receptor posee anticuerpos contra una dada molécula de HLA, se deposita complemento y, de la misma forma que antes, el colorante vital puede penetrar (*Figura 7A*). El grupo de “donantes” aleatoriamente seleccionados tiene como objetivo representar al conjunto de posibles donantes cadavéricos ^[108]. De esta manera, el porcentaje de anticuerpos reactivos contra el panel (ARP) da una idea estimativa de las posibilidades que tienen un dado receptor de tener una reacción inmune contra su donante efectivo. Si de 40 donantes, reacciona positivamente con 10, el paciente posee un ARP del 25% ^[119]. Este método tienen como limitación clara que el resultado depende del panel. Muchos paneles comerciales no representan exactamente la variedad alélica del HLA en una dada población. Además, se generan falso positivos con anticuerpos no anti-HLA ^[108].



- **Determinación de anticuerpos en fase sólida:** Surgen de la necesidad de un método más sensible, que permita distinguir anticuerpos no anti-HLA y, principalmente, diferenciar HLA de Clase I y II [108]. Sobre una fase sólida, que puede ser una placa (para ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; ELISA) o una microesfera (para citometría de flujo), se adsorben moléculas de HLA purificadas [117]. Luego, se ponen en contacto con el suero del receptor y, a través de anticuerpos anti-IgG humana con un sistema de detección acoplado, se identifica no sólo la presencia sino también la especificidad de los anticuerpos anti-HLA. La *Figura 7B* y *7C* muestra un ejemplo del método por citometría de flujo y las características de los métodos disponibles, respectivamente.

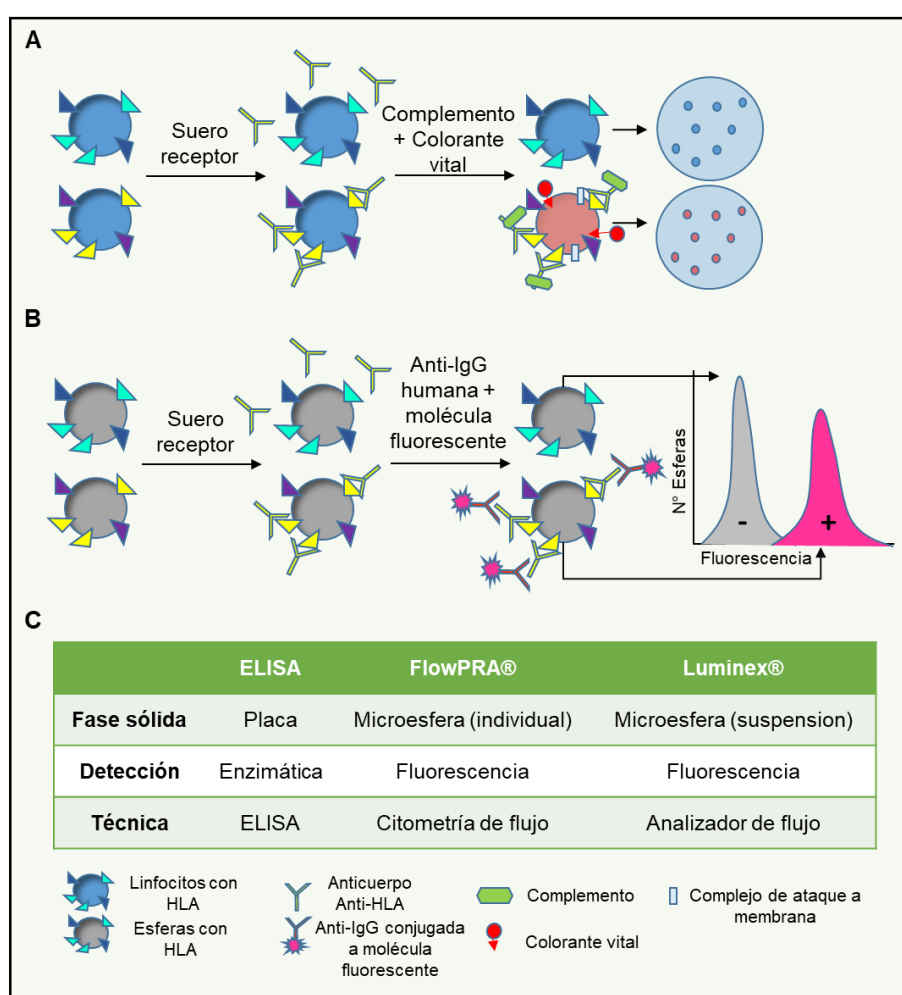
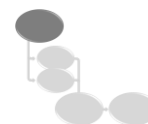


Figura 7: Detección de anticuerpos anti-HLA. A) Método de citotoxicidad celular. B) Método en fase sólida or citometría de flujo. C) Tabla comparativa de los distintos métodos de detección de anticuerpos anti-HLA en fase sólida.

- **Prueba cruzada (Crossmatch):** Las técnicas empleadas para realizar la prueba cruzada son las mismas que se utilizan para la detección de anticuerpos aloreactivos. La diferencia, en este caso, radica en que las pruebas se realizan con el suero del



receptor y las células del donante potencial. Se realiza previo al trasplante y un resultado positivo implica que el receptor tiene anticuerpos preformados contra el donante ^[120, 121]. Antiguamente, un resultado positivo implicaba no continuar con el procedimiento de trasplante pero, luego, se conoció que existen falsos positivos contra moléculas no-HLA y generados a partir de IgM o IgG autoreactivas. Esto último se descarta realizando una prueba cruzada con linfocitos y suero del receptor ^[108].

Existe una variante de la prueba cruzada que es denominada *prueba cruzada virtual* (PCV) ^[122]. La misma se realiza previamente al crossmatch real y se utiliza la información dada por las pruebas de determinación de anticuerpos del receptor y la tipificación de HLA del donante. Esto permite tener una estimación del resultado del crossmatch real, lo cual implica una disminución de tiempo ^[123]. El crossmatch virtual da lugar a falsos positivos con bajo título de algunos anticuerpos o cuando una de las técnicas empleadas para las determinaciones es más sensible que la otra. Los falsos negativos provienen, como se ha mencionado antes, que los paneles para realizar los test no siempre tienen representada la variedad alélica de una población dada y cuando el suero empleado no es reciente ^[108]. Por lo cual, el resultado de la PCV debe ser cuidadosamente interpretado y no reemplaza a la prueba cruzada real.

Cada uno de estos ensayos se realizan en un momento específico del procedimiento de trasplante y algunos de ellos pueden continuar luego del mismo (*Figura 8*) ^[119]. Los mismos estiman ciertos riesgos que deben ser evaluados por el equipo de médicos involucrados en el procedimiento y así proceder a la toma de decisiones.

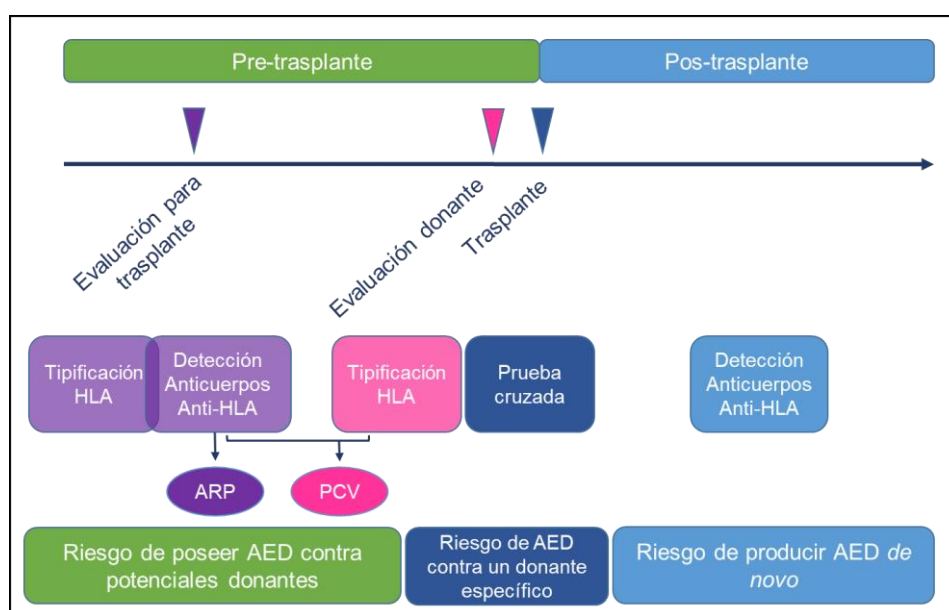
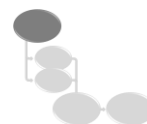


Figura 8: Test de histocompatibilidad en el tiempo. HLA, antígeno leucocitario humano; ARP, anticuerpos reactivos contra panel; PCV, prueba cruzada virtual; AED, anticuerpos específicos contra el donante.



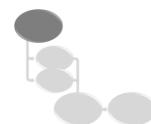
III- Rechazo de injertos

Después del aloreconocimiento, se desatan los mecanismos celulares y moleculares asociados al proceso de rechazo. Los eventos de rechazo se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de los mismos o al momento pos-trasplante en el que se producen.

1. Según la naturaleza del evento de rechazo:

- Rechazo celular: Está mediado íntegramente por linfocitos T. Las CPA que portan un péptido no propio en el contexto de las HLA migran hacia sitios inductores (nódulos linfáticos, Placas de Peyer, etc.) donde promueven la presentación antigénica a los linfocitos T por diversas vías anteriormente desarrolladas (*Figura 6*)^[96, 97]. Cabe recordar que los LT CD4⁺ reconocen péptidos en el contexto de las moléculas del CMH de Clase II mientras que, los LT CD8⁺, en el contexto de las de Clase I (*Tabla 2*)^[86, 87]. Para que la activación celular se produzca se necesita, además, de una segunda señal provista por la interacción de moléculas coestimuladoras en las CPA (B7-1 y B7-2; CD80 y CD86 respectivamente) con moléculas de superficie en los linfocitos (CD28)^[124]. Estas dos primeras señales desatan eventos intracelulares como el aumento de calcio intracelular y, a consecuencia de ello, la activación de la enzima calcineurina. Esta última, activa el factor de transcripción NFAT que, una vez en el núcleo, induce la transcripción del gen que codifica para IL-2. Esta citoquina de acción autócrina y parácrina constituye la tercera señal de activación y, cuando se une a su receptor en la membrana del linfocito, induce la diferenciación y proliferación de los mismos^[66].

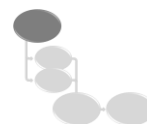
Los mecanismos efectores dependen de si la presentación fue realizada a un linfocito CD4⁺ o CD8⁺. Los linfocitos CD8⁺, una vez activados, se diferencian a linfocitos T citotóxicos (LTC) y migran al injerto para actuar directamente sobre la célula blanco causando apoptosis^[125]. En general, la muerte celular la provocan liberando gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzima B y, ocasionalmente, a través de la vía Fas-Fas ligando^[126]. Los linfocitos CD4⁺, por su parte, una vez activados pueden diferenciarse a diferentes perfiles. En un ambiente pro-inflamatorio predominan los perfiles Th1 y Th17 que secretan IFN γ /FNT α e IL-17, respectivamente^[127, 128]. Esta respuesta mediada por citoquinas recluta a otros tipos celulares como macrófagos, NKs y monocitos, que en última instancia agudizan aún más el proceso inflamatorio. Los linfocitos Th2, a pesar de ser secretores de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4, suelen producir también citoquinas como IL-5, IL-9 e IL-13 que dan inicio a respuestas humorales o al reclutamiento de eosinófilos^[129]. En este contexto, el órgano o tejido implantado sufre un daño que puede dar lugar a la pérdida de función del mismo.



- **Rechazo humoral:** Este tipo de rechazo no está mediado por células, sino por moléculas solubles: anticuerpos. Hemos detallado previamente que los anticuerpos anti-HLA constituyen una barrera importante para el éxito del trasplante ^[101]. También, se ha mencionado la existencia de anticuerpos preformados por distinto tipo de exposiciones a moléculas del CMH no propias (transfusiones, embarazos, etc.) y de aquellos que son sintetizados *de novo* ^[103]. Para la formación de estos últimos se requiere que un linfocito T CD4⁺ que tomó contacto con una molécula HLA en el contexto del CMH active un linfocito B virgen. Éste se activa y diferencia en célula plasmástica secretando anticuerpos específicos contra dicha molécula ^[130]. Una vez en el injerto, los anticuerpos reconocen su blanco y se adhieren. En última instancia, las CDs o Mφ con sus receptores de porciones Fc los reconocen y dan lugar al proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpo. Este consiste en la liberación de granzima B y perforina, por parte de las DCs, u óxido nítrico, FNTα y especies reactivas del oxígeno (EROs), por parte de los Mφ, causando daño celular. Alternativamente, a través de una cascada proteolítica se produce la activación del complemento que da lugar a la inducción de coagulación por parte del endotelio y a la formación de los complejos de ataque a membrana (CAM) ^[131]. Estos últimos forman poros en la membrana celular causando la muerte y la pérdida de la integridad vascular. Este proceso se denomina citotoxicidad dependiente de complemento.

2. Según el tiempo de aparición:

- **Rechazo Hiperagudo:** Se produce a los pocos minutos de restaurado el flujo sanguíneo del receptor y se caracteriza por ser una respuesta humoral por parte de anticuerpos preformados contra el donante ^[132, 133]. Los anticuerpos anti-HLA se unen al endotelio y activan el complemento. La injuria producida en el mismo induce los mecanismos de coagulación y, como resultado de ello, se produce la trombosis u oclusión de los vasos y la necrosis del injerto ^[101].
- **Rechazo Agudo:** Se sucede de semanas a meses pos-trasplante. Si bien por mucho tiempo se lo consideró un proceso netamente celular, en los últimos años se ha reconocido la importancia del componente humoral ^[134]. Se caracteriza por la injuria en el parénquima (producida directamente por los linfocitos T o por citoquinas secretadas por ellos que atraen células inmunes activadas, así como también por la unión de anticuerpos y la activación del complemento), la presencia de infiltrado inflamatorio y la endotelitis (inflamación del endotelio).

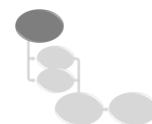


- **Rechazo Crónico:** Tiene lugar en un pos-trasplante avanzado. Se caracteriza por la proliferación de fibroblastos, células endoteliales y/o epiteliales, depósitos de colágeno en los vasos sanguíneos y en el parénquima produciendo fibrosis, isquemia y la posterior pérdida de función del órgano ^[135]. Una serie de estudios lo han vinculado al proceso de presentación indirecta, donde no hay una acción directa de los linfocitos activados sobre el órgano sino que se produce a través de mediadores solubles como citoquinas y anticuerpos ^[136, 137].

Si bien hasta aquí se han descripto eventos agrupados dentro de la inmunidad adquirida, existen ciertos componentes de la inmunidad innata que actúan de forma temprana y generan un ambiente menos propicio para la supervivencia del injerto. El tejido a implantar sufre, a lo largo de la intervención, injuria antígeno-independiente ^[138]. La mayoría de los órganos para trasplante, provienen de donantes con muerte cerebral y esto se ha asociado a un aumento de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6, FNT α , IFN γ , factor estimulante de colonia de granulocitos y M ϕ (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 ^[139-141], así como también a un incremento de la expresión de moléculas de adhesión y del CMH Clase II ^[142]. Por otro lado, la isquemia e hipoxia durante la procuración y el transporte del órgano y la posterior restauración del flujo sanguíneo generan un daño conocido como *injuria por isquemia-reperfusión*. Esta última se caracteriza por una rápida infiltración de neutrófilos en respuesta a aumentos de IL-8, lo que da lugar al reclutamiento posterior de otras células del sistema inmune como macrófagos ^[142]. El tejido sometido a injuria da lugar a una serie de moléculas, como proteínas nucleares o de choque térmico, llamadas colectivamente patrones moleculares asociados al daño (PMAD) que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) en las células del sistema inmune innato ^[143, 144]. Estas células activadas, como las células dendríticas, promueven la iniciación de los mecanismos efectores de la inmunidad adquirida correspondientes a la alorespuesta ^[124].

IV-Terapia inmunosupresora

La “tolerancia asociada al trasplante” implica una no reacción o falla al reaccionar del sistema inmune frente a antígenos no propios ^[145]. Dado que el sistema inmune ha evolucionado para afrontar la presencia de antígenos foráneos, este tipo de tolerancia no es un mecanismo fisiológico. Sin embargo, la manipulación de ciertos procesos permite una larga sobrevida del injerto. Este término fue acuñado por Medawar y colaboradores en los años 50, cuando



demonstraron que los aloinjertos de piel en ratas no eran rechazados si la receptora tomaba contacto con células del donante en su etapa gestacional ^[146].

Dado que la inyección de células en fetos no es aplicable a la clínica, otro tipo de procedimiento era necesario. Poco tiempo después, un grupo de investigadores demostró que si se debilitaba el sistema inmune de ratones con irradiación, era posible la inyección de médula ósea de una cepa donante y, así, se evitaba el rechazo de injertos de piel provenientes de la misma ^[147]. Posteriormente, el método se trasladó a un trasplante de riñón en un perro ^[148] y de forma casi inmediata a trasplantes renales en humanos ^[149-152]. A partir de esta metodología, se realizó el primer trasplante exitoso de riñón en humanos entre individuos genéticamente diferentes ^[149]. Varios estudios posteriores reafirmaron la factibilidad de la irradiación como método atenuante de la inmunidad pero sin la necesidad de la inyección de médula ósea. Por lo que la inmunosupresión, y no el quimerismo, era condición suficiente para el éxito de los trasplantes ^[151, 152].

De forma contemporánea, se iniciaron investigaciones que iban a terminar reemplazando a la irradiación por el tratamiento con drogas inmunosupresoras. La primera de ellas fue la mercaptopurina-6 (MP-6), que originalmente era utilizada como droga oncológica. En estos trabajos, se demostró que la MP-6 disminuía la respuesta mediada por anticuerpos a albúmina bovina en conejos ^[153] y, luego, extendía levemente la sobrevida de injertos de piel ^[154]. Este fue el inicio de una carrera que se extiende hasta nuestros días en la cual se buscan, en primer lugar, inmunosupresores más potentes para alargar la sobrevida del injerto, y, posteriormente, aquellos que tuvieran menos efectos adversos (*Figura 9A*) ^[155].

Los regímenes de inmunosupresión dependen exclusivamente del órgano a trasplantar así como, también, del riesgo inmunológico de cada paciente. En base a la experiencia de los diferentes centros de trasplante, se fueron diseñando protocolos especiales para cada órgano. Sin embargo, y a pesar de las diferencias individuales, la mayoría suelen constar dos etapas: inducción y mantenimiento ^[66]. La primera etapa implica lograr que el injerto sea tolerado al momento del implante, mientras que la segunda intenta mantener reprimida la alorespuesta de forma sostenida en el tiempo. Actualmente existen varios inmunosupresores, de naturaleza farmacológica o proteica (anticuerpos), que tienden mayoritariamente a bloquear la activación y proliferación de linfocitos T (*Figura 9B*) ^[155, 156]. Estos inmunosupresores se clasifican, según en la etapa en la que se utilicen, como inmunosupresores de inducción o mantenimiento (*Tabla 4*) ^[157].

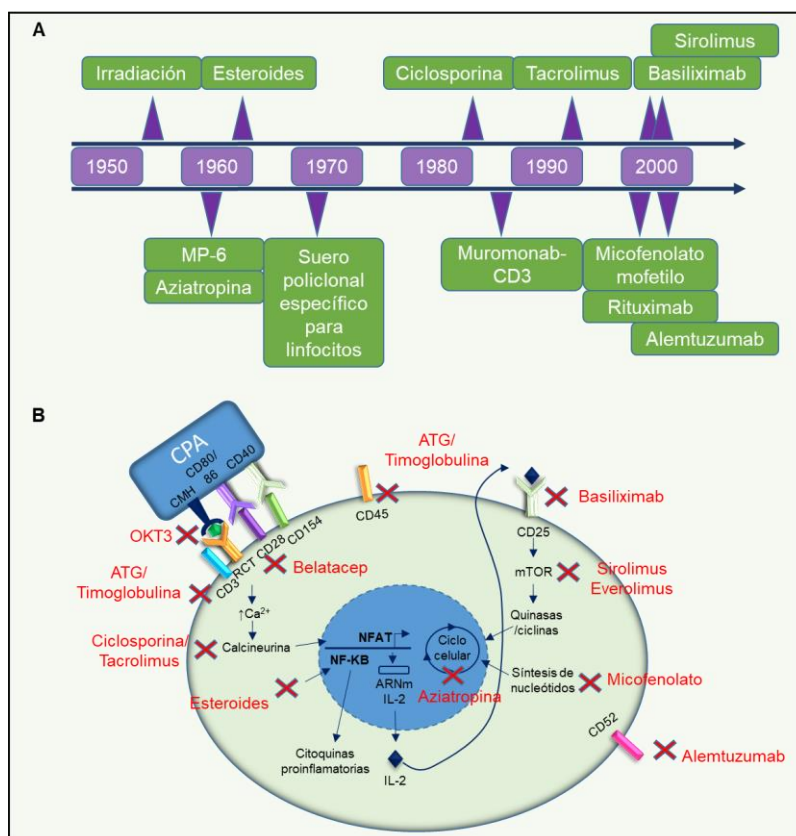
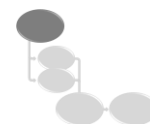


Figura 9: Agentes inmunosupresores. A) Aparición de los diferentes agentes inmunosupresores en el tiempo. B) Mecanismos de acción de los inmunosupresores más utilizados sobre los linfocitos T. CPA, célula presentadora de antígeno; LT, linfocito T; OKT3, muromonab-CD3; CMH, molécula del complejo mayor de histocompatibilidad; RCT, receptor de célula T.

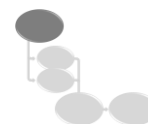
Ante un evento de rechazo, la inmunosupresión de mantenimiento cambia. Puede incorporarse otro agente al esquema así como, también, incrementarse la dosis de ellos [66].

Trasplante Intestinal

I-Insuficiencia intestinal

El trasplante de órganos se define esencialmente como el procedimiento quirúrgico mediante el cual se produce el reemplazo de un órgano con falla terminal o irreversible por otro, de un donante vivo o cadavérico, con el objeto de restituir las funciones del mismo en el receptor [158]. Por lo que, antes de adentrarnos en el trasplante intestinal, es conveniente definir inequívocamente el concepto de insuficiencia intestinal.

La insuficiencia intestinal (II) es la incapacidad por parte del intestino, y particularmente de los enterocitos, de incorporar los nutrientes, las sales y minerales y el agua requeridos para



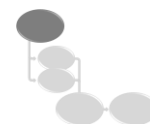
cumplir con las necesidades nutricionales del organismo ^[159]. La II se clasifica funcionalmente en 3 categorías ^[159, 160]:

- II Tipo 1: Está asociada a algún procedimiento quirúrgico abdominal. Es temporaria, autolimitada y requiere mínimo soporte nutricional o de fluidos.

Agente	Naturaleza	Blanco/Efecto
INDUCCIÓN		
rATG/Timoglobulina	Anticuerpo policlonal	CD3, CD45, CD8, CD4, CD2, CD11a, CD18, CD25, ALH-DR, cadena pesada HLA Clase I
Muromonab-CD3 (OKT3)	Anticuerpo monoclonal	CD3
Basiliximab	Anticuerpo monoclonal	CD25
Alemtuzumab	Anticuerpo monoclonal	CD52
Rituximab	Anticuerpo monoclonal	CD20
MANTENIMIENTO		
Aziatropina	Farmacológica	Inhibe el ciclo celular por falta de síntesis de purinas.
Esteroides	Farmacológica	Inhibe la producción de citoquina corriente abajo de NF- κ B.
Ciclosporina	Farmacológica	Inhibe la transcripción del gen de IL-2 por inhibición de calcineurina y de NFAT.
Tacrolimus	Farmacológica	Inhibe la transcripción del gen de IL-2 por inhibición de calcineurina y de NFAT.
Micofenolato mofetil o ácido	Farmacológica	Inhibe el ciclo celular por falta de síntesis de purinas.
Sirolimus/ Everolimus	Farmacológica	Detiene la progression del ciclo celular por inhibición de la quinasa mTOR.
Belatacept (CTL4-Ig)	Farmacológica	Inhibe la coestimulación vía B7-CD28.

Tabla 4: Agentes inmunosupresores clasificados según su utilización en las fases de inducción y mantenimiento de la inmunosupresión.

- II Tipo 2: Se relaciona con complicaciones sépticas, metabólicas y nutricionales complejas secundarias a eventos agudos traumáticos, como accidentes o intervenciones quirúrgicas, o a eventos agudos impredecibles como la formación de vólvulos intestinales y fistulas enterocutáneas o el infarto mesentérico. Estos pacientes requieren soporte nutricional durante meses para recuperar la autonomía.
- II Tipo 3: Hace referencia a la II crónica (IIC), donde los pacientes han alcanzado estabilidad nutricional a través del soporte y pueden llegar a utilizarlo por años. Si estos pacientes no rehabilitan su función intestinal, se considera que la IIC es, además, irreversible.



Las causas de insuficiencia intestinal son variadas y suelen estar agrupadas según el rango etario del paciente ^[161-164]. Las más comunes se hallan listadas en la *Tabla 5*. Las mismas pueden ser clasificadas en dos condiciones fisiopatológicas ^[161, 165]:

- **Falla anatómica**: La II es causada por la pérdida efectiva de superficie de absorción y da lugar al llamado síndrome de intestino corto (SIC). Suele ser la condición más frecuente tanto en adultos como en niños ^[161-163].
- **Alteración funcional**: La II es causada, por ejemplo, por desórdenes de motilidad o ciertas enfermedades epiteliales que impiden una buena absorción ^[161].

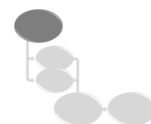
Pacientes pediátricos	Pacientes adultos
Gastrosquisis	Isquemia
Desorden de motilidad (ej, POCl)	Enfermedad de Crohn
Vólvulos	Vólvulos
Enteritis necrotizante	Desorden de motilidad (ej, POCl)
Atresia intestinal	Trauma
Enteropatía del intestino delgado (ej, enfermedad de inclusión de microvellosidades) o diarrea intratable de la infancia	Tumores
Otras (ej, enteritis autoinmune, tumores)	Otras

Tabla 5: Principales causas de la insuficiencia intestinal en pacientes adultos y pediátricos. POCl, Pseudo-obstrucción crónica intestinal.

En la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF (Hospital Universitario Fundación Favaloro), desde marzo de 2006 a febrero de 2017, se evaluaron 310 pacientes con II de orígenes diversos ^[166]. De los pacientes que finalmente fueron sometidos a trasplante intestinal, cerca de un 26% desarrollaron II a causa de vólvulo y otro 16% debido a la Enfermedad de Hirschsprung ^[167]. En porcentajes menos significativos, también se observaron casos de II resultada de eventos de isquemia, gastrosquisis y atresia (*Figura 10*). Cerca del 80% de los pacientes perdió autonomía nutricional a partir de una falla anatómica y, por ende, padecieron SIC.

II-Soporte nutricional y rehabilitación

El intestino delgado cumple una función de extrema relevancia en cuanto al mantenimiento de la nutrición y, por ende, fundamental para la vida de un individuo ^[1, 2]. La única estrategia



de reemplazo disponible para aquellos pacientes con falla intestinal es el soporte nutricional a través de la nutrición parenteral total (NPT). Antes de la implementación de la misma a fines de los años 60s ^[168], la pérdida de función intestinal tenía consecuencias fatales ^[169].

La NPT consiste en administrar vía intravenosa soluciones ricas en glucosa, lípidos, amino ácidos, vitaminas y electrolitos, evitando los procesos de ingestión, digestión y absorción ^[170]. Se puede administrar vía un acceso venoso central (NPT central, NPTC) o periférico (NPT periférica, NPTP). Una vez que se ha regularizado la situación nutricional inmediata del paciente, comienza la fase de rehabilitación.

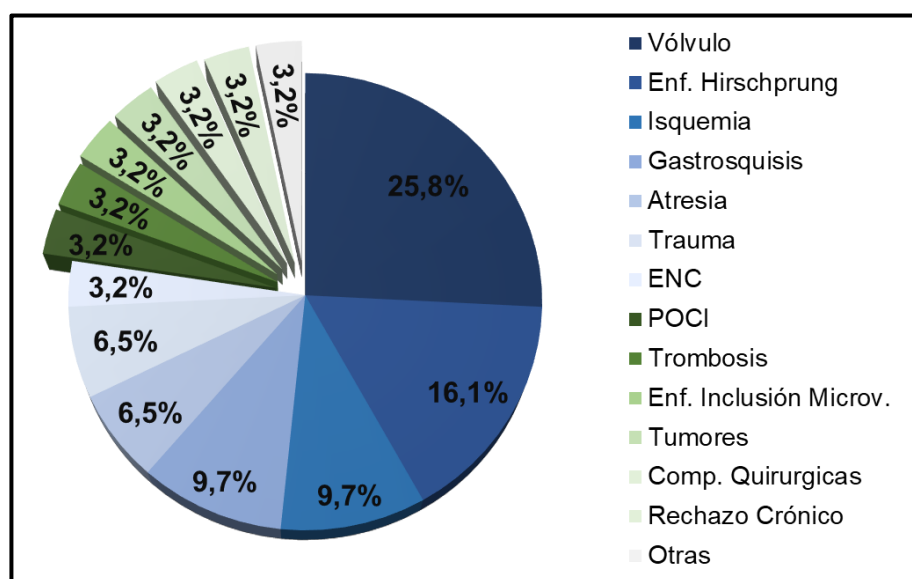
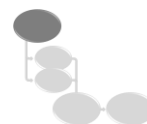


Figura 10: Causas de insuficiencia intestinal pacientes con trasplante intestinal la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF. ENC, enteritis necrotizante; POCl, pseudo-obstrucción crónica intestinal; Enf. Inclusión microv., enfermedad de inclusión de microvellosidades; Comp. Quirúrgicas, complicaciones quirúrgicas. Modificado a partir de Ramisch et al. *Transplantation Proceedings*, 48, 457-462 (2016).

En los pacientes con SIC, el intestino remanente sufre ciertos cambios que tienden a compensar la función absorbente: incrementar el espesor de la mucosa, la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas ^[171]. Estos se producen como consecuencia de estímulos internos y externos tales como nutrientes, secreciones gastrointestinales, hormonas, factores de crecimiento y otros factores genéticos/bioquímicos ^[172].

Para potenciar el proceso de rehabilitación y mejorar la calidad de vida de los pacientes disminuyendo el requerimiento de NPT, son utilizados diferentes tipos de fármacos ^[173]. Los mismos tienden a contrarrestar los cambios anatómicos, funcionales y fisiológicos que se producen en el SIC. Agentes antidiarreicos, como la loperamida, son administrados para disminuir la motilidad y, así, aumentar el tiempo de contacto del contenido intestinal con los enterocitos para facilitar la absorción ^[174]. Los antiácidos, por su parte, disminuyen las



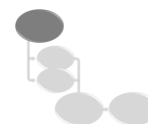
excesivas secreciones gastrointestinales y la consecuente diarrea ^[175]. La falta de motilidad intestinal conduce a un crecimiento exacerbado de la flora intestinal y, como consecuencia de ello, a la malabsorción debido al consumo directo de nutrientes o a la malabsorción de lípidos por la deconjugación de las sales biliares y requiere tratamiento antibiótico ^[176]. La reciente incorporación del teduglutide, un análogo del péptido tipo glucagón 2 (GLP-2, *del inglés glucagón like peptide-2*), en el manejo de pacientes con SIC ha arrojado resultados promisorios ^[177]. El GLP-2 es un péptido pequeño liberado por las células endocrinas del intestino delgado distal y el colon proximal. Éste estimula el crecimiento de la mucosa, incrementa el flujo sanguíneo, mejora la función de la barrera intestinal y puede, también, disminuir la motilidad y las secreciones ^[178]. El teduglutide, incrementa la absorción de nutrientes y fluidos en pacientes con SIC y reduce el requerimiento en volumen de PN ^[179], incluso lográndose la independización en algunos casos ^[180, 181].

También existen alternativas quirúrgicas en pos de la rehabilitación y se agrupan bajo el término “reconstrucción autóloga del tracto intestinal”. Algunas de ellas tienen como objetivo aumentar la longitud intestinal cuando existe dilatación y, otras, en la inversión de segmentos intestinales para enlentecer el tránsito ^[172]. Como todo procedimiento quirúrgico, tienen riesgos asociados como dehiscencia de las anastomosis, estenosis y potencial injuria vascular ^[182].

En ciertos casos, donde la rehabilitación no fue lograda o por las propias características de la II, se requiere NPT por largos períodos de tiempo. Las mejoras en el manejo de la técnica y el impulso de los resultados favorables llevaron al desarrollo de la NPT domiciliaria ^[183]. Por lo que, pacientes con estas características podían recibir soporte nutricional tiempos prolongados fuera de una institución de sanidad. No obstante, la dependencia de NPT sostenida está asociada a complicaciones que terminan repercutiendo en la sobrevida media de los pacientes la cual ha sido reportada como 93%, 71%, 59% y 28% a 1, 5, 10 y 20 años de tratamiento, respectivamente ^[184]. Las principales complicaciones asociadas a la NPT son la sepsis asociada a catéter, la pérdida de accesos venosos por trombosis del mismo, la enfermedad hepática que en casos severos da lugar a cirrosis, el desbalance hidroelectrolítico y la consecuente litiasis y falla renal ^[173].

III-Trasplante intestinal: indicaciones y contraindicaciones

El trasplante intestinal (TxI) es el procedimiento quirúrgico por el cual se reemplaza el intestino delgado de un paciente, que presenta insuficiencia intestinal irreversible y se ve imposibilitado de continuar con soporte nutricional, por otro de un donante vivo o cadavérico ^[185, 186].



Existen varios tipos de trasplante intestinal, dependiendo de si el injerto intestinal se trasplanta de forma aislada o en combinación con otros órganos abdominales (*Figura 11*) ^[185, 187]. La elección de uno u otro procedimiento depende de la etiología subyacente a la II, la condición de los órganos nativos, la presencia/severidad de enfermedad hepática, así como también la historia de cirugías abdominales previas ^[188].

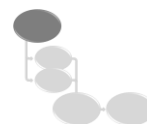
Tipos de trasplante intestinal			
Aislado	Combinado	Multivisceral	Multivisceral modificado
<ul style="list-style-type: none"> Intestino delgado 	<ul style="list-style-type: none"> Intestino delgado Hígado 	<ul style="list-style-type: none"> Intestino delgado Hígado Páncreas Estómago 	<ul style="list-style-type: none"> Intestino delgado Páncreas Estómago

Figura 11: Variantes del trasplante intestinal. Se muestran los distintos tipos de trasplante y los órganos implicados en cada procedimiento quirúrgico. En las ilustraciones, los órganos trasplantados se representan en rojo y los nativos en gris.

Como ya se ha mencionado, para ser un probable receptor de un TxI es indicación presentar complicaciones graves asociadas a la NPT. Sin embargo, esas complicaciones pueden volverse tan severas e incompatibles con la vida por lo que el TxI ya no constituye una posibilidad viable. Por ende, el tiempo de indicación del TxI es muy importante ^[189]. El trabajo de equipos multidisciplinares (gastroenterólogos, cirujanos, nutricionistas, psicólogos, etc.) ha demostrado ser muy eficiente en el abordaje de un paciente con II ^[190].

Las **indicaciones para trasplante por falla de la NTP** son ^[188]:

- Daño hepático secundario a NPT.
- Trombosis de al menos dos de los accesos vasculares centrales clásicos.
- Al menos dos episodios de sepsis relacionadas al catéter que requirieron hospitalización.
- Al menos un episodio de fungemia, shock séptico o síndrome de distrés respiratorio asociado al catéter.
- Episodios de deshidratación severa a pesar del aporte por NPT.



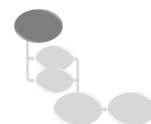
Otras indicaciones para trasplante incluyen ^[188]:

- Alto riesgo de mortalidad asociada a la patología subyacente a la II (tumores desmoides asociados a poliposis adenomatosa familiar, síndrome de intestino ultra corto, desórdenes congénitos de la mucosa).
- II con alta morbilidad (hospitalizaciones frecuentes, dependencia de narcóticos), función intestinal nula (pseudo-obstrucción, grandes pérdidas por ostomía) o baja aceptación de la NPT (pacientes jóvenes).

Las **contraindicaciones** del TxI son similares a las de trasplante de otros órganos e incluyen: infecciones sistémicas y locales no tratadas (bacterianas, virales o fúngicas), tumores malignos, inmunodeficiencias, patologías cardiopulmonares o/y neuronales avanzadas, desórdenes psiquiátricos severos, señales de no obediencia a las indicaciones médicas (por falta de apoyo familiar, por ejemplo), entre otras ^[191].

A nivel mundial, así como también en nuestro centro, la mayor proporción de los pacientes incluidos en lista para TxI incurren en alguna de las fallas a la nutrición parenteral ^[166, 167, 192]. En la *Figura 12A* se muestran las indicaciones para TxI en nuestra Unidad hasta Febrero de 2017, donde las prevalentes son la falta de accesos vasculares (42,2%), enfermedad hepática asociada a NP (22,2%) y sepsis asociada al catéter (13,3%). También se observan algunos casos donde la indicación de trasplante es la misma patología subyacente a la II (Enfermedad de inclusión de microvellosidades, por ejemplo) o la pérdida injerto por rechazo de un trasplante previo.

Si en lugar de observar la progresión completa se tienen en cuenta distintos períodos de tiempo en la evolución del programa ^[166], se puede notar que la falta de accesos vasculares (FAV) es una indicación que no sufrió grandes variaciones y su representación aproximada es del 40% de la población trasplantada. Sin embargo, la enfermedad hepática manifiesta una reducción en el último período probablemente debido al incremento de la experiencia de los profesionales y a la inclusión en lista de forma anticipada ^[192].



IV-El trasplante intestinal en números

El primer trasplante de intestino delgado aislado en humanos fue realizado en 1964 ^[193], muchos años después de que el cirujano francés Alexis Carrel realizara las primeras experiencias en anastomosis vasculares junto al trasplante heterotópico de intestino en cuellos de perros en 1901. Por estos experimentos recibió el premio Nobel de medicina en 1912.

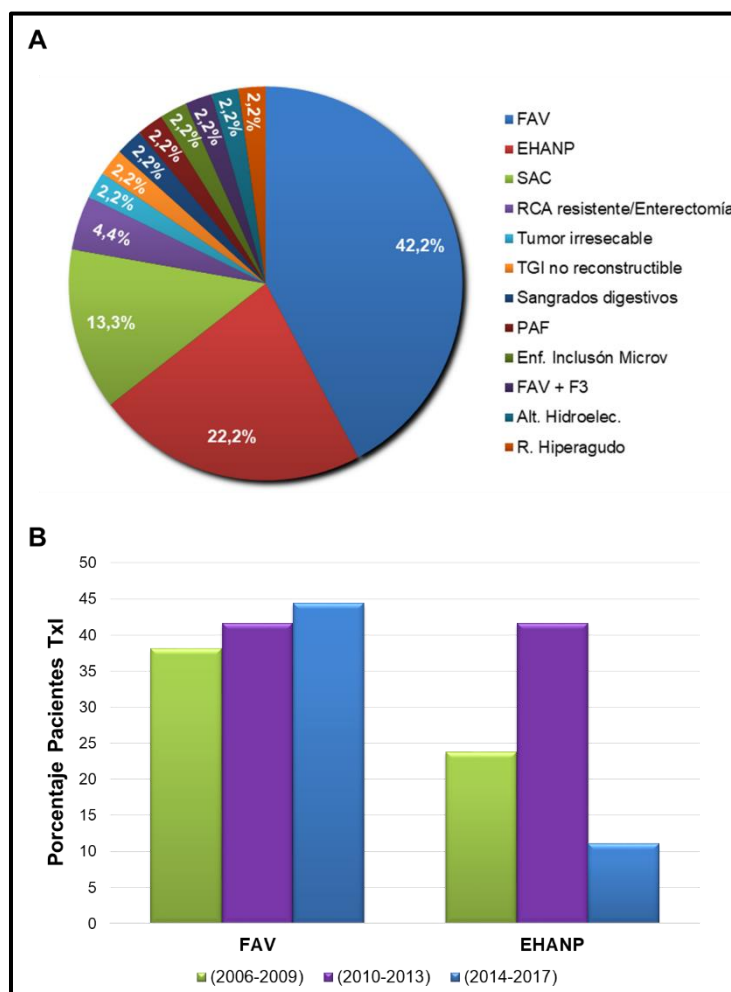
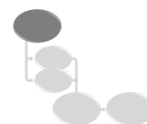


Figura 12: Indicaciones de TxI la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF 2006-Feb 2017. A) Se toman en cuenta todos los trasplantes realizados en el período mencionado de forma conjunta. B) Indicaciones prevalentes teniendo en cuentas los diferentes períodos del programa de trasplante. FAV, falta de accesos vasculares; Alt. Hidroelec., alteraciones hidroelectrolíticas; EHANP, enfermedad hepática asociada a nutrición parenteral; TGI, tracto gastrointestinal; RCA, rechazo celular agudo; PFA, poliposis adenomatosa familiar; F3, fibrosis grado 3; R., rechazo. Modificado y/o actualizado a partir de Ramisch et al. *Transplantation Proceedings*, 48, 457-462 (2016) y Rumbo et al. *Transplantation*, 101(6S2): S54 (2017).

A fines de los años 50s se retomaron los estudios en animales y se realizaron algunos ensayos pre-clínicos ^[194, 195]. Thomas Starzl, reportó el primer trasplante multivisceral con 192 días de supervivencia de un paciente pediátrico en 1989 y eso significó la revalorización del TxI ^[196]. Para fines de los años 90s, se había generado un Registro Internacional de Pacientes con

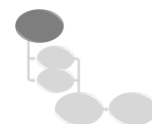


Trasplante Intestinal que anunciaba 180 procedimientos en 170 pacientes ^[197]. Si bien los comienzos no fueron promisorios debido a la alta incidencia de rechazo, sepsis y complicaciones técnicas ^[198, 199]; el avance en las terapias inmunosupresoras, la estandarización de los procedimientos quirúrgicos y la mejora en los cuidados posoperatorios significaron un importante progreso ^[200, 201]. Por lo que, el Txl evolucionó en unas pocas décadas de un procedimiento experimental a una práctica habitual establecida para el tratamiento de pacientes con insuficiencia intestinal ^[192].

En la actualidad, ya se han realizado más de 2890 trasplantes en 2700 pacientes en todo el mundo ^[202]. El mayor volumen de procedimientos se halla concentrado en América del Norte y, particularmente, en centros de Estados Unidos ^[203]. En Sudamérica, la actividad comienza a hacerse notable a partir del 2006 lo cual coincide con la creación de la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF (*Figura 13A*) ^[190]. Si bien el número total de trasplantes intestinales mostraba una tendencia creciente en las primeras dos décadas de registro, a partir del año 2007 empezó a evidenciar una merma a raíz de las mejoras en el manejo de la nutrición parenteral y la rehabilitación quirúrgica de los pacientes con II (*Figura 13B*) ^[188]. Lo mismo puede notarse en las curvas tanto de pacientes trasplantados adultos como pediátricos, estos últimos suelen ser levemente más frecuentes.

En cuanto a los tipos de trasplante, las proporciones se mantienen constantes excepto la de los trasplantes combinados que tiende a reducirse en los últimos años (*Figura 13C*). Probablemente, se corresponda con la disminución de las indicaciones de Txl por EHANP. La supervivencia del injerto y de los pacientes se ha ido incrementando conforme se han implementado mejores esquemas de inmunosupresión, perfeccionado las técnicas quirúrgicas y el seguimiento del paciente una vez finalizado el procedimiento (*Figura 13D*) ^[188]. La supervivencia de los pacientes documentada al momento es de 77% al año, 58% a los 5 años y 47% a los 10 años. Mientras que la supervivencia del injerto es de 71%, 50% y 41%, respectivamente ^[202]. Estos porcentajes varían si se desglosan en los diferentes tipos de trasplantes ^[204]. Se ha asociado a una mejora en la sobrevida del injerto con la espera de los pacientes en lista en sus domicilios, la menor edad de los receptores, el injerto intestinal combinado con hígado y el mantenimiento usando sirolimus ^[202].

Los resultados obtenidos en nuestro centro son muy aproximados a las tendencias mundiales reportadas. Desde el 2006 al 2017, se han realizado 48 trasplantes en 44 pacientes (*Figura 14A*). La mayor proporción de los pacientes fueron pediátricos (33 Txl = 68,8%), de los cuales 27 procedimientos fueron con injerto intestinal aislado, 3 combinados y 3 multiviscerales. Entre los pacientes adultos (15 Txl = 31,2%), se llevaron a cabo 10 Txl aislados, 1 combinado, 3



multiviscerales y 1 multivisceral modificado (con riñón). En la *Figura 14B* podemos observar que, de la misma manera que a nivel internacional, en número de trasplantes cae a partir del año 2007.

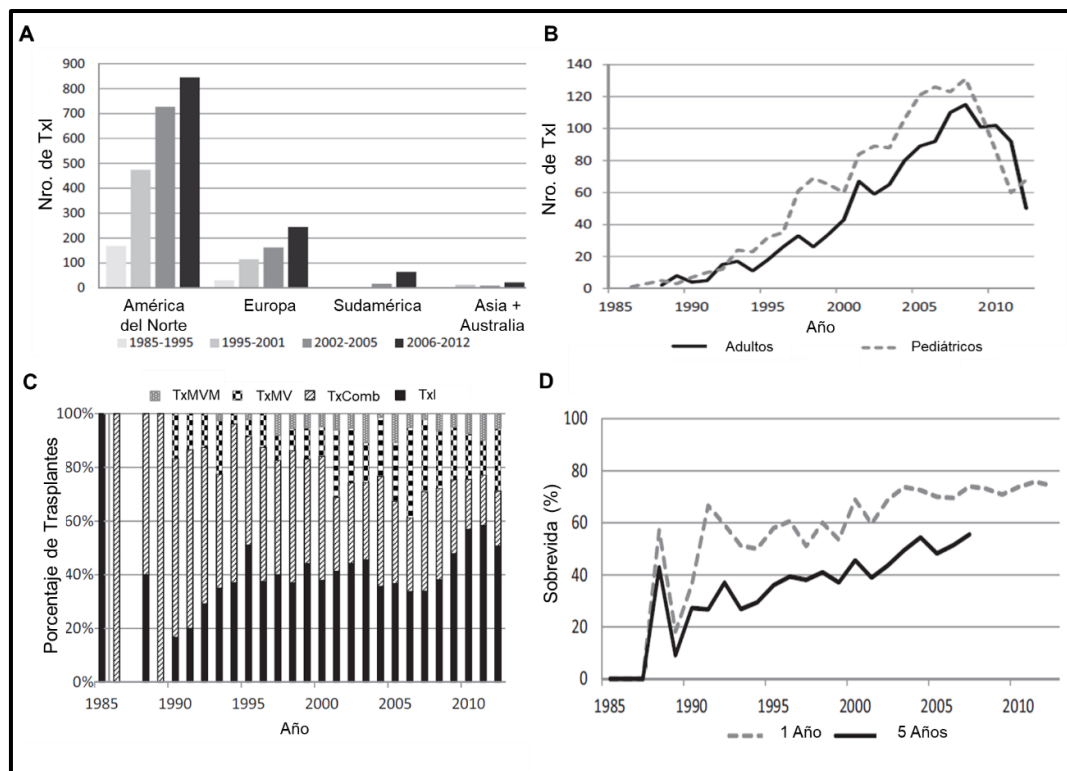
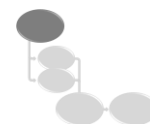


Figura 13: El TxI a nivel mundial. A) Número de trasplantes realizados por continente. B) Evolución del número total de procedimientos realizados en pacientes adultos y pediátricos. C) Los distintos tipos de trasplante intestinal a través del tiempo. D) Supervivencia actuarial del injerto a 1 y 5 años postrasplante. TxI, trasplante intestinal; TxMV, trasplante multivisceral; TxMVM, TxMV modificado; TxIA, TxI aislado. Modificado a partir de Grandt et al. *Am J Transplant*, 15: 210–219 (2015).

La supervivencia de los pacientes al año es del 74%, mientras que se reduce a 63,4%, 51,3% y 47,6% a los 3, 5 y 7 años, respectivamente (*Figura 14C*)^[166]. Estos datos posicionan a la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF junto a los demás centros de mayor experiencia y volumen de trabajo en el mundo.

V-Particularidades inmunológicas del TxI e Inmunosupresión

El trasplante intestinal representa un desafío inmunológico mayor que los trasplantes de otros órganos sólidos^[205]. En la sección “Inmunología de la mucosa” se ha profundizado sobre muchas de las características que hacen del intestino un órgano particular para el trasplante.



Posee un gran tamaño y tiene función de barrera. Esto último implica la exposición a un ambiente hostil, que le impone desarrollar mecanismos tolerogénicos hacia los antígenos de los alimentos mientras que es capaz de mantener controlada la flora bacteriana normal y patogénica [206]. Es en este contexto de equilibrio inmunológico en el cual hay que situar al trasplante.

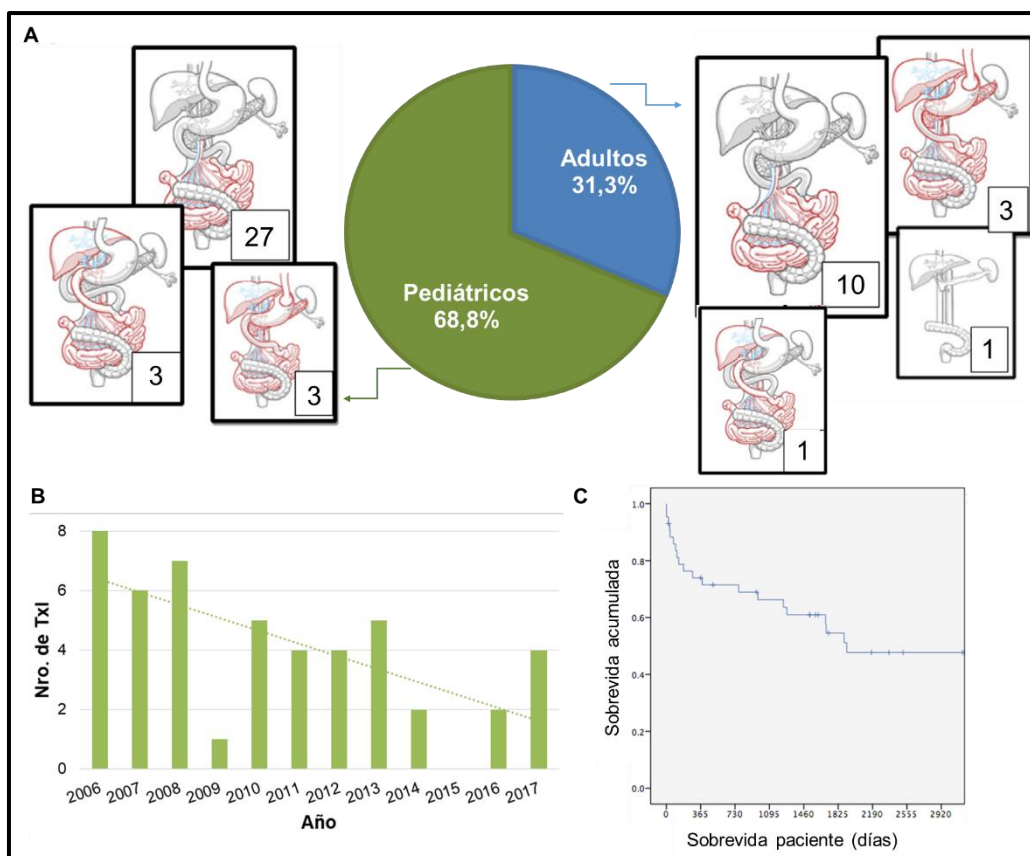
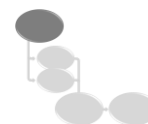


Figura 14: TxI en la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante intestinal de HUFF, 11 años de experiencia. A) Distribución etaria de los pacientes receptores. Se indica además el tipo de trasplante intestinal en cada caso. B) Número de procedimientos realizados en el tiempo. C) Sobrevida actuarial de los pacientes. Modificado y/o actualizado a partir de Ramisch et al. *Transplantation Proceedings*, 48, 457-462 (2016) y Rumbo et al. *Transplantation*, 101(6S2): S54 (2017).

El intestino alberga a aproximadamente el 80% de la población de células del sistema inmune de un individuo [206]. Nuestro grupo ha demostrado, mediante el análisis de células provenientes del drenaje abdominal, que a los pocos días postrasplante las células inmunes del receptor comienzan a poblar en injerto [207]. Para el día 4, el 90% de las células inmunes presentes en el líquido del drenaje pertenecen al receptor. En lámina propia, ha sido reportado que ese porcentaje se alcanza aproximadamente a los 60 días [208]. Mientras este se recambio se produce, las células epiteliales y otras células no inmunes del injerto (que mantienen el genotipo del donante) se exponen a más y más células capaces de detectar dichas diferencias a partir de las moléculas de HLA en su superficie. Al delicado equilibrio



antes mencionado, el trasplante intestinal le agrega las variables de gran inmunogenicidad interna y quimerismo ^[185].

El hecho de que el intestino, a diferencia de otros órganos, esté expuesto a un ambiente no estéril cualquier falla en los mecanismos de defensa puede producir la disrupción de la barrera y la translocación de microorganismos patogénicos. Esta situación puede comprometer gravemente la vida del paciente ^[185]. La injuria por isquemia-reperfusión producida durante el procedimiento quirúrgico del trasplante y dos importantes complicaciones postrasplante como son las infecciones y el rechazo, son ejemplos de procesos capaces de alterar la homeostasis intestinal.

Por los motivos antes mencionados, la inmunosupresión fue la clave para el establecimiento del TxI como opción quirúrgica para los pacientes con II. En años 90s, la introducción del tacrolimus y sus promisorios resultados en comparación con la ciclosporina marcó un antes y un después en el desarrollo y aplicación de la técnica ^[201, 209-211].

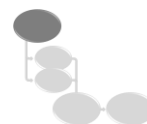
Durante muchos años, los profesionales del área en todo el mundo exploraron diferentes regímenes de inmunosupresión con el fin de encontrar aquel que evitara las reacciones inmunológicas propias de la aloinmunidad sin dejar al paciente inmunocomprometido totalmente. Si bien existen diferencias entre los centros, los protocolos suelen comprender una etapa de inducción y otra de mantenimiento (*Tabla 4*, sección Bases de la aloinmunidad/Terapias inmunosupresoras).

En nuestro centro, los regímenes de inmunosupresión se constituyeron de acuerdo al riesgo inmunológico de los pacientes determinado en la evaluación pre-trasplante (*Tabla 6*) ^[167].

Bajo riesgo inmunológico	Alto riesgo inmunológico
<ul style="list-style-type: none">▪ Trasplante intestinal aislado▪ Grupo ABO compatible▪ <30% ARP	<ul style="list-style-type: none">▪ Trasplante combinado o multivisceral▪ Retrasplante▪ Grupo ABO incompatible▪ >30% ARP*▪ Prueba cruzada positiva con células B*

Tabla 6: Clasificación de los pacientes en cuanto al riesgo inmunológico. * Para ambos casos se utiliza un protocolo de desensibilización previo ^[212]. ARP, anticuerpos reactivos contra panel.

- Pacientes con bajo riesgo inmunológico: Reciben inducción con anticuerpos que bloquean la señalización de la IL-2 (tercera señal de activación linfocitaria) como Basiliximab (anti-CD25) en los días 0 y 4 postrasplante. Mientras que el mantenimiento se realiza con tacrolimus y esteroides combinados con micofenolato mofetil.



- Pacientes con alto riesgo inmunológico: Se induce con timoglobulina y el mantenimiento es realizado con tacrolimus y esteroides pero, en este caso, combinados con sirolimus.

En caso de producirse un evento de rechazo, infección o alguna otra complicación la inmunosupresión se modifica según la severidad del proceso.

VI- Complicaciones del trasplante intestinal

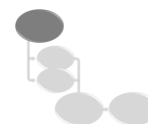
Las complicaciones del trasplante intestinal son variadas y suelen sucederse de manera frecuente. Muchas de ellas, pueden llevar a la pérdida del injerto o a la muerte del paciente ^[192]. La pérdida del injerto obliga a recaer en la NP y a plantear la necesidad de retrasplante, que suele tener peores resultados.

Las complicaciones clínicas más recurrentes luego de un trasplante intestinal pueden clasificarse según su origen en complicaciones inmunológicas y complicaciones asociadas a la drogas inmunosupresoras.

Dentro de las **complicaciones inmunológicas** se encuentran:

1. Rechazo del injerto: Previamente, se han descripto de forma detallada las características del rechazo sin reparar en el tipo de órgano que se va a trasplantar. No obstante, los mismos principios aplican para el TxI. La diferencia radica en contexto inmunológico que ofrece el órgano ^[185], lo cual aumenta la incidencia del fenómeno.

- El rechazo agudo se presenta en aproximadamente el 45% de los pacientes en el primer año postrasplante ^[202] ^[203], obstaculizando la mejoría de la supervivencia posterior. Como ya se ha mencionado, se produce por la respuesta de las células T a los aloantígenos presentes en el injerto. Los síntomas clínicos suelen ser dolor abdominal, fiebre, aumento de las pérdidas por ostomía y vómitos ^[192]. Sin embargo, estos síntomas no son demasiados específicos y el diagnóstico inequívoco se realiza mediante el análisis histopatológico ^[213]. Al igual que en otros órganos, recientemente se ha encontrado evidencia de un componente humoral en el rechazo agudo ^[214]. Dado que las terapias inmunosupresoras están dirigidas hacia células T, muchos pacientes con eventos de rechazo son refractarios al tratamiento ^[215]. El tratamiento con rituximab (en combinación con esteroides) en rechazos agudos con título de anticuerpos específicos contra donante ha mostrado resultados satisfactorios en una serie pequeña de casos ^[216]. En la *Figura 15A*, se resume el número actualizado de casos de rechazo en la serie de trasplantes de nuestro centro hasta Diciembre de 2017 (48



trasplantes, 44 pacientes) y en la *Figura 15B* las complicaciones asociadas a la pérdida del injerto.

Este tópico es de fundamental importancia para el desarrollo de la tesis, por lo que será profundizado en el Capítulo 1.

- El rechazo crónico: Ocurre en un 15% de la población trasplantada entre el primero y el quinto año postrasplante ^[192]. Se produce daño vascular del órgano por arteriopatía obliterativa y a consecuencia injuria por isquemia. La inflamación crónica debida al gran infiltrado inflamatorio da lugar a fibrosis del parénquima y la consecuente aparición de adhesiones. A nivel endoscópico, se observa una mucosa ulcerada o una superficie luminal achatada a raíz del embotamiento de las vellosidades ^[217]. El tratamiento con inmunosupresores puede calmar los síntomas (diarrea, ulceraciones), pero la enterectomía y posterior re-trasplante constituye la mejor opción para el paciente ^[218]. En nuestra Unidad, se han registrado 5 eventos de rechazo crónico (10,9% de incidencia), los cuales llevaron a la pérdida del injerto (*Figura 15*).

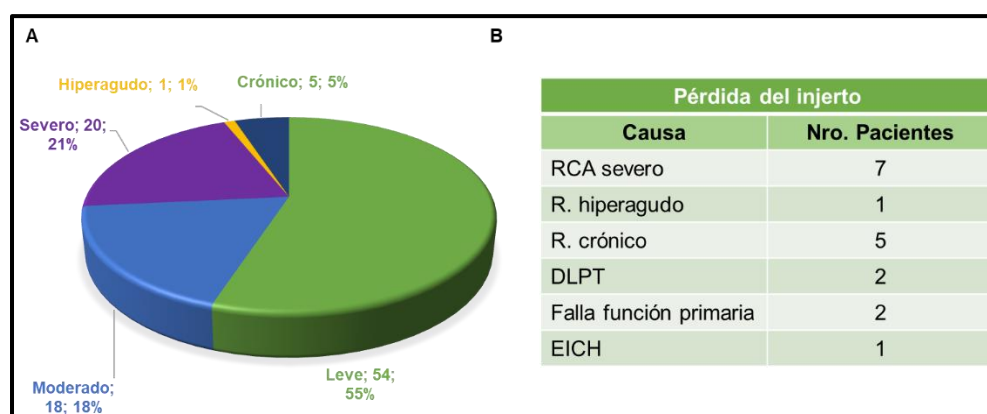
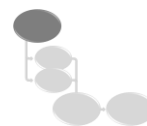


Figura 15: Eventos de rechazo y complicaciones asociadas a pérdida del injerto la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal de la HUFF. RCA, rechazo celular agudo; R., rechazo; DLPT, desorden limfoproliferativo postrasplante; EICH, enfermedad de injerto contra huésped.

2. Infecciones: La inmunosupresión en el trasplante tiene como finalidad disminuir la respuesta T contra aloantígenos. Sin embargo, los mecanismos empleados para lograrlo son inespecíficos y afectan al sistema inmune en su totalidad. Esta circunstancia, sumada a la exposición a patógenos intrahospitalarios, provoca que las infecciones en el curso del postrasplante sean muy frecuentes ^[219]. El intestino en su calidad de órgano de barrera representa un riesgo aún mayor y las complicaciones infecciosas constituyen una importante causa de muerte o pérdida del injerto postrasplante ^[220]. Se ha reportado que un 94% de los pacientes con trasplante intestinal sufrió infecciones bacterianas, otro 67% padeció alguna infección viral y el 28% alguna fúngica ^[221].

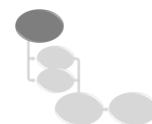


Las infecciones postrasplante se pueden dividir según el momento de ocurrencia. Las *infecciones inmediatas* (producidas antes de las 6ta semana postrasplante) son asociadas a los cuidados posquirúrgicos y principalmente producidas por bacterias (bacterias gram negativas entéricas, enterococo y estafilococo) y distintas especies de *Cándida* o *Aspergillus* ^[222]. Las mismas comprenden infecciones del torrente sanguíneo, intra-abdominales, respiratorias, urinarias y del sitio quirúrgico. Las primeras infecciones bacterianas se suceden entre el noveno y onceavo día posoperatorio. Para el primer mes postrasplante, el 58% de los pacientes han sufrido al menos un episodio y, una vez alcanzado el segundo mes, la proporción alcanza el 80% ^[223, 224]. Estos episodios han sido asociados con la disminución del 15% de la sobrevida del paciente al año postrasplante comparado con aquellos pacientes que no cursaron una complicación infectológica ^[225].

Infecciones más tardías, son consideradas aquellas que se producen luego de la sexta semana postrasplante. Si bien los riesgos de contraer infecciones bacterianas o fúngicas están latentes, la incidencia de las mismas en este período suele ser menor ^[222]. Durante el mismo cobran relevancia las infecciones virales, alcanzando a representar el 66% de las infecciones en el injerto ^[226]. Entre los agentes causales de enteritis virales más comunes podemos citar: rotavirus, adenovirus, norovirus, citomegalovirus (CMV) y virus Epstein-Barr (VEB). Estos dos últimos tienen mayor índice de morbilidad. Las infecciones virales suelen afectar en mayor medida a pacientes pediátricos; no obstante, pacientes adultos no están exentos a ellas ^[227]. Las enteritis virales son clínicamente indistinguibles de los episodios de rechazo, por lo que el control endoscópico e histopatológico es fundamental. Cabe hacer notar que, mientras que el tratamiento del rechazo es aumentar la inmunosupresión, el de la enteritis es disminuirla. Por lo que, un diagnóstico equivocado puede tener consecuencias fatales ^[222].

A sabiendas, los centros de trasplante cuentan con un protocolo de profilaxis peri y posoperatorio tendientes a disminuir la incidencia de estos eventos ^[188].

3. Enfermedad de injerto contra huésped (EICH): Como su nombre lo indica, esta complicación del trasplante intestinal consiste en una alorespuesta por parte del órgano trasplantado contra el receptor ^[228]. Existen dos modalidades de EICH, la celular y la humoral. La forma celular implica la activación de linfocitos derivados del donante, que fueron transferidos con el injerto, la expansión clonal de los mismos y el daño en los órganos sanos. La modalidad humoral, por su parte, se produce después de un trasplante ABO incompatible. Los linfocitos B del donante producen anticuerpos contra los eritrocitos del receptor ^[229].



La incidencia de esta complicación en el trasplante intestinal varía, según distintos reportes, de 1 a 17% [228, 230, 231]. En la historia del trasplante intestinal de la Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF, solo se ha observado 1 caso de EICH, que llevó a la pérdida del injerto (*Figura 15B*) [166]. El mismo fue receptor de un re-trasplante multivisceral con bazo y riñón del donante, coincidiendo con los factores de riesgo de EICH descritos por Wu y colaboradores en la Universidad de Miami [232].

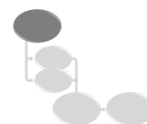
Las manifestaciones de la EICH incluyen irritación cutánea, úlceras en el intestino nativo, lesiones en la mucosa de la boca entre otras y suele ser más frecuente luego de trasplantes multiviscerales [228].

4. Desorden linfoproliferativo postrasplante (DLPT): Esta complicación está relacionado con los altos niveles de inmunosupresión y la infección con el virus Epstein-Barr. Las células B infectadas con el virus, en ausencia de la restricción por parte de las células T, proliferan de forma descontrolada incluso llegando a formar linfomas [233]. La incidencia en el trasplante intestinal en particular descendió de 30% a 13% mediante la implementación del monitoreo de la carga viral en los pacientes [222, 234]. Los síntomas del DLPT incluyen: inflamación en los ganglios, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia, fiebre, nódulos subcutáneos, dolor de garganta, inflamación de las amígdalas, náuseas, vómitos, dolor abdominal, sangrado gastrointestinal, entre otros [233]. Esta patología disminuye la sobrevida del paciente al año postrasplante [234] y se ha demostrado que el riesgo de muerte es del 19% cuando el virus es contraído en pacientes menores de 5 años. Luego de los 10 años, dicho riesgo es prácticamente nulo [192]. El tratamiento del mismo incluye rituximab y disminución de la inmunosupresión.

En nuestra serie de pacientes se observaron dos casos de pérdida de injerto asociadas a DLPT (*Figura 15B*) [166], uno de ellos era portador de un trasplante intestinal aislado y el segundo constituyó una presentación aguda en un trasplante multivisceral.

Las **complicaciones asociadas al uso de drogas inmunosupresoras** comprenden daño hepático, neurológico y renal [235, 236]. La estandarización de un protocolo de inducción de inmunosupresión, disminuye los niveles de tacrolimus necesarios para el mantenimiento. Esto puede llegar a disminuir la incidencia de daño renal [237], por ejemplo, que tiene una incidencia actual de 21,5% a los 5 años postrasplante [238].

A partir de lo expuesto, queda evidenciada la fundamental importancia que tiene tratar de evitar dichas complicaciones y, si no es posible, promover su pronta resolución a través de un exhaustivo seguimiento postrasplante del paciente.



VII-Seguimiento postrasplante

La observación crítica de los pacientes con TxI tiene como objetivos evaluar la función del injerto y la de otros órganos abdominales, la supervisión de los niveles de inmunosupresión y la anticipación o hallazgo temprano de complicaciones asociadas.

Indistintamente del tipo de TxI que se implemente en un paciente, durante la cirugía se realiza una ileostomía ^[190]. Es decir, el extremo del íleon es exteriorizado en la pared abdominal con el fin de recolectar desechos. No obstante, constituye un acceso directo al órgano trasplantado mediante endoscopia y permite la toma de biopsias para el diagnóstico histológico. Éste último, es el actual *gold standard* para el monitoreo del injerto ^[213].

La Unidad de Soporte Nutricional, Rehabilitación y Trasplante Intestinal del HUFF, como en la mayoría de los centros de trasplante intestinal, ha establecido un protocolo de toma de biopsias. La lógica del mismo es la siguiente: biopsias más frecuentes durante los primeros meses postrasplante, donde las complicaciones suelen ser más abundantes; y luego, la frecuencia de las mismas va disminuyendo paulatinamente (*Figura 16*). La primera biopsia suele realizarse a los 5-7 días postrasplante. Durante ese tiempo se produce la reparación del daño por isquemia reperusión, si es que lo hubo.

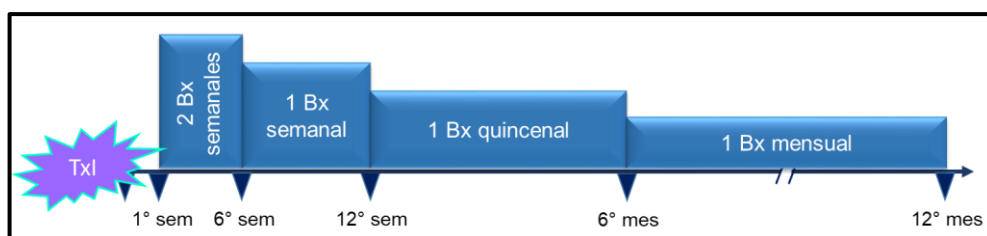
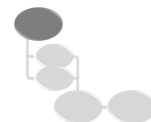


Figura 16: Protocolo de toma de biopsias para seguimiento postrasplante. TxI, trasplante intestinal; Bx, biopsia.

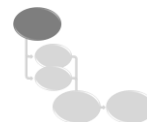
Luego del año, y en ausencia de complicaciones, al cerrar la ostomía se reconstruye el tracto. A partir de ese momento, los controles se hacen vía endoscopia digestiva baja generalmente cada 3 meses o más. Esto depende de la adherencia del paciente al tratamiento y al seguimiento. En caso de existir alguna complicación de las antes mencionadas el protocolo se reanuda.

Además se realizan un examen físico y otro nutricional, complementados con análisis de laboratorio con recuento leucocitario, fórmula, concentración de inmunosupresores en sangre, indicadores de función renal, hepática y pancreática. Esto permite tener una visión global del estado del paciente y así proceder a la toma de decisiones tendientes a lograr la independencia de la nutrición parenteral y la mejora en la calidad de vida.



Por último, es de remarcar que la generación de conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos subyacentes al trasplante intestinal en humanos permitirá, en un futuro cercano, el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de las complicaciones asociadas aumentando la aplicabilidad del mismo con el fin último de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Este trabajo de tesis, fue elaborado con la convicción, dedicación y conciencia de querer aportar un pequeño avance que pueda resultar en un cambio radical para alguien en un futuro próximo.

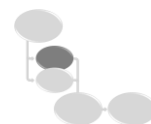


OBJETIVO GENERAL

En base a la problemática presentada y con el fin de generar conocimientos que mejoren la aplicabilidad del TxI, el objetivo general de este trabajo fue analizar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el rechazo celular agudo del trasplante intestinal humano.

Objetivos específicos

1. Identificar el tipo de células blanco en las criptas durante el rechazo celular agudo.
2. Determinar la presencia, función y blanco celular de la población ILC3 en pacientes con trasplante intestinal.
3. Definir el rol de las células T CD4 de la lámina propia en el rechazo celular agudo en pacientes con trasplante intestinal.



CAPÍTULO I: Análisis de los blancos celulares del rechazo celular agudo en la cripta intestinal

Introducción

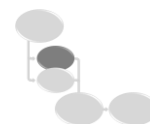
I-Rechazo celular agudo y diagnóstico en trasplante intestinal

Los grandes avances en las técnicas quirúrgicas, el cuidado pos-operatorio de los pacientes y la aplicación de distintos protocolos de inmunosupresión han permitido mejorar los resultados e incrementar la aplicabilidad del TxI. No obstante, la incidencia de RCA es mayor que en otros órganos y continúa siendo la principal causa, tanto temprana como alejada, de pérdida del injerto, necesidad de retrasplante y muerte asociada al procedimiento ^[188, 239, 240]. Según reportes de distintos centros especializados, un porcentaje que varía entre el 30-50% de los receptores aún sufre episodios de rechazo en los primeros 90 días postrasplante ^[230, 241]. Estos valores han mejorado aquellos de las primeras series ^[197], pero siguen siendo preocupantes. Si bien el RCA es más frecuente en los primeros 3 meses postrasplante, casos tardíos asociados al desarrollo de anticuerpos contra el injerto o como consecuencia de bajos niveles de inmunosupresión por abandono del tratamiento han sido reportados. Éstos, en general, se presentan en forma avanzada y se han asociado a un mayor riesgo de pérdida de injerto y a la necesidad de enterectomía del mismo para salvaguardar la vida del paciente ^[242, 243].

La reducción de los episodios de rechazo y la inducción de tolerancia se han convertido en dos de los objetivos más importantes en el campo del TxI; ya que, a pesar de los esfuerzos y del amplio número de trabajos de investigación dedicados a la temática, los resultados continúan siendo poco alentadores ^[145]. Hasta el momento de redacción de la presente tesis, sólo hemos encontrado un caso de un paciente con tolerancia operacional que permaneció sin complicaciones a pesar de haber discontinuado la terapia inmunosupresora por un período mayor a los 2 años ^[244]. Por lo dicho, el riesgo de que se produzcan eventos de RCA permanece latente durante toda la vida del paciente.

Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de análisis serológicos o no invasivos, resulta en que el método estándar para el monitoreo del estado del injerto y el diagnóstico de rechazo continúe siendo el análisis histopatológico en biopsias con guía endoscópica ^{[245] [213]}.

El número y la frecuencia de biopsias por protocolo varían de centro a centro. Sin embargo, suelen ser más frecuentes durante los primeros meses postrasplante debido a la alta incidencia de complicaciones ^[243].



Durante el VIII Simposio Internacional de Trasplante Intestinal realizado en Miami en el año 2003, se estableció un criterio unificado de diagnóstico y clasificación del rechazo celular agudo [213]. Los parámetros evaluados son: 1) extensión del daño en la mucosa, 2) nivel de infiltrado inflamatorio, 3) número de cuerpos apoptóticos en el epitelio críptico.

Según el mismo, existen diferentes grados de severidad del rechazo postTxI que evidencian diferencias en la extensión del daño observado a nivel endoscópico en primera instancia y, posteriormente, en los cortes histológicos (*Figura 1.1*):

- ❖ *Sin rechazo*: El injerto muestra características histológicas similares a un intestino nativo.
- ❖ *Rechazo indeterminado*: Mínimo daño centralizado en las criptas intestinales con un leve aumento del número de apoptosis (<6/10 criptas). Se observan algunos focos aislados de infiltrado inflamatorio en la lámina propia.
- ❖ *Rechazo leve*: Presencia de edema y congestión vascular, con el consecuente ensanchamiento vellositario y distorsión de la arquitectura intestinal. Aumento del número de apoptosis cada 10 criptas (>6/10 criptas) y del nivel de infiltrado en la lámina propia.
- ❖ *Rechazo moderado*: Mayor grado de distorsión de la arquitectura que el indicado para el rechazo leve. Se cuantifica un número > 6 apoptosis /10 criptas o la presencia varias apoptosis en una sola cripta (“pop-corn” apoptosis o apoptosis en rosetas de maíz). La severidad del infiltrado varía de moderado a severo. Frecuentemente se observan erosiones epiteliales focales, aunque esta característica no es necesaria para el diagnóstico.
- ❖ *Rechazo severo*: Dependiendo de la duración del rechazo, suele notarse la desaparición total de las criptas. Por lo que, ya no se hace posible el recuento de apoptosis. Se observan erosiones focales de la mucosa y el infiltrado en la lámina propia es muy importante. En estadios tardíos, se pierde totalmente la arquitectura intestinal con ausencia de vellosidades y denudación completa de la lámina propia. Este último es denominado rechazo exfoliativo.

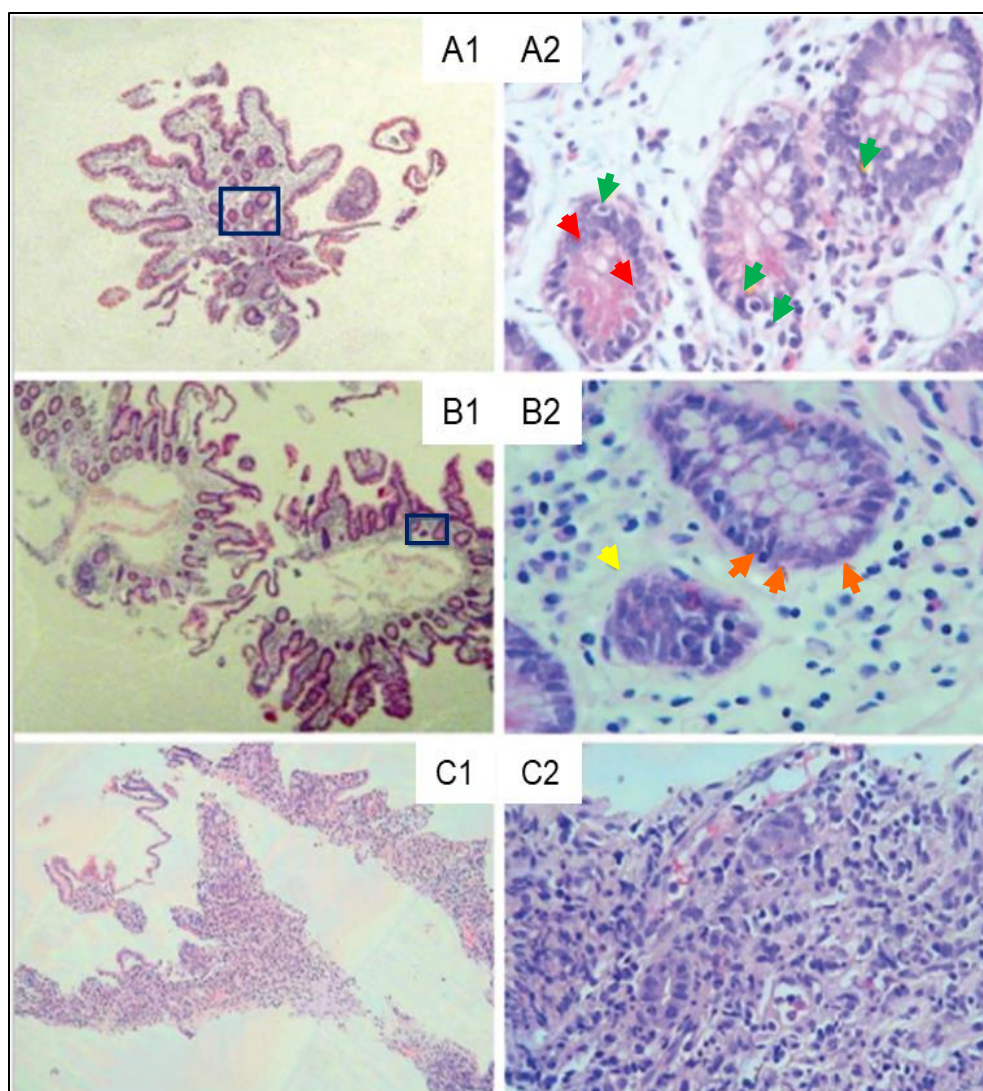
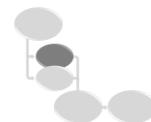
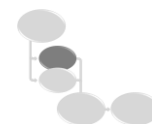


Figura 1.1: Histología del rechazo celular agudo. (A) Rechazo celular agudo leve: 1-Distorsión de la arquitectura leve a expensas de edema. 2- Incremento del número de apoptosis crípticas (flechas rojas.) e infiltrado inflamatorio (flechas verdes). HE, 1 (25X), 2 (400X). (B) Rechazo celular agudo moderado: 1- Distorsión de la arquitectura moderada a expensas de acortamiento vellositario, edema e infiltrado inflamatorio en la lámina propia. 2- Criptas con aumento de la actividad apoptótica, abundantes y focalmente confluentes (flechas naranjas) e injuria epitelial (flecha amarilla) con inflamación mixta leve en la lámina propia. HE, 1 (25X), 2 (400X). (C) Rechazo severo exfoliativo: 1- Daño severo de la arquitectura con exfoliación amplia del epitelio superficial. 2- Lámina propia severamente inflamada y deserción críptica confluyente. HE, 1 (25X), 2(400X). Gentileza Dra. Agustina Zambarnardi.

Las características distintivas de cada estadio se hallan resumidas en la *Tabla 1.1*.

Los eventos de rechazo se presentan en general de forma heterogénea (parches) en el injerto, por lo que no es anormal encontrar diferentes grados de rechazo en una misma endoscopia con biopsias múltiples. No obstante, el diagnóstico siempre se hará en base a los peores hallazgos.



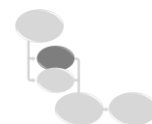
Severidad	Cuerpos Apoptóticos	Infiltrado	Daño Epitelial	Grado
Sin rechazo	<2/10 criptas	-	-	0
Indeterminado	2-6/10 criptas	Mínimo	-	1
Leve	≥6/10 criptas	Leve	-	2
Moderado	>6/10 criptas o 2/criptas	Moderado	Focal	3
Severo	No disponible	Severo	Severo	4

Tabla 1.1: Descripción simplificada del criterio histológico de diagnóstico de rechazo celular agudo.

El proceso que antecede al rechazo de injertos es el alorecognition, por parte los linfocitos T del receptor, de las moléculas HLA en la superficie del órgano o tejido implantado [86, 87, 96]. Una vez que se ha producido la presentación de antígenos no propios a los linfocitos T CD8⁺ (o citotóxicos) y/o a los linfocitos T CD4⁺, estos desatan mecanismos efectores que provocan la muerte celular programada o apoptosis de las células blanco [125, 126].

La apoptosis es un proceso que se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento a modo de regulación de las células en los tejidos [246] [247]. También, constituye un mecanismo de defensa que regula las respuestas inmunes y elimina células dañadas o infectadas [248]. Cabe volver a recalcar el rol de este mecanismo en el proceso de regeneración epitelial del intestino, tal y como ha sido descrito en la introducción general [7]. A diferencia de la necrosis que cursa con hinchazón celular y posterior pérdida del contenido citoplasmático, la apoptosis se caracteriza por la contracción celular, fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto, formación de cuerpos apoptóticos (fragmentos celulares) y la expresión de ligandos específicos para células fagocíticas [246]. Existen tres vías alternativas que desatan los eventos antes mencionados: intrínseca, extrínseca y dependiente de granzima B. Éstas convergen en una vía efectora común que involucra a las caspasas [249]. Estas últimas son enzimas proteolíticas, que se encuentran constitutivamente expresadas en forma de procaspasas en el citoplasma celular. Al clivarse, se activan y pueden clivar a otras procaspasas que se encuentren corriente abajo en la vía. La última caspasa en la cascada, o la más importante, es la caspasa 3 (CASP3). Ésta activa endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material genético y proteasas que fragmentan las proteínas nucleares y del citoesqueleto, dando lugar a los eventos tardíos de la apoptosis.

Durante el rechazo, los LT CD8⁺ o las células NK reclutadas por los LT CD4⁺ pueden causar la muerte celular de las células blanco principalmente mediante la vía dependiente de



Granzima B o mediante la vía extrínseca a partir del sistema Fas - Fas ligando (FasL) [125, 126]. La primera, consiste en la liberación de gránulos contenidos en el citoplasma de los LT CD8⁺ que contienen perforina (una enzima que produce poros en la membrana de la célula blanco) y granzima B, una proteasa que al ingresar a la célula puede activar la procaspasa 10 o directamente a la procaspasa 3 [250]. En la segunda, una vez que el FasL se une a su receptor en la célula blanco, ciertas proteínas intracelulares son reclutadas formando un complejo proteico que activa a la procaspasa 8 [251]. Ésta activa a la procaspasa 3, dando inicio a la vía ejecutora. Las células NK, a través de los receptores de porción Fc, también pueden inducir daño tisular si hay anticuerpos adheridos al injerto.

En el caso del RCA posTxI, si bien se utiliza el recuento de cuerpos apoptóticos para el diagnóstico, no ha sido determinado que tipo celular dio origen.

II-La cripta intestinal

La presentación en etapas y la heterogeneidad de "estados de evolución" del proceso de rechazo a lo largo del injerto intestinal indican que es posible que puedan estar mediándolo distintos mecanismos, los cuales no son totalmente conocidos.

Independientemente de la complejidad de los procesos de rechazo, el epitelio de las criptas de Lieberkühn constituye el blanco inicial del mismo [213]. Como se ha adelantado en la Introducción general, en las criptas se pueden distinguir dos zonas: la zona de amplificación en tránsito (ZAT), que alberga a los intermediarios de diferenciación de las células epiteliales del intestino en continua proliferación, y la zona del fondo (ZF) que contiene a las células madre intestinales (ISC, del inglés *Intestinal Stem Cells*) y a las células de Paneth (*Figura 1.2*) [252].

Las células madre son las responsables de la constante regeneración de la barrera epitelial y su reconstrucción en caso de injuria [253], mientras que las células de Paneth tienen como función principal la producción de péptidos antimicrobianos, como α defensina 5 (DEFA5) y lisozima (LYZ), para impedir la translocación bacteriana [254, 255]. Éstas últimas son, junto a células del estroma circundante, secretoras de factores que protegen y regulan la actividad de las ISC. Por lo que el daño en cualquiera de estos tipos celulares, podría impedir o al menos perjudicar el proceso de restauración epitelial. Este hecho convierte a las CP y a las ISC en actores fundamentales de la inmunidad innata [256].

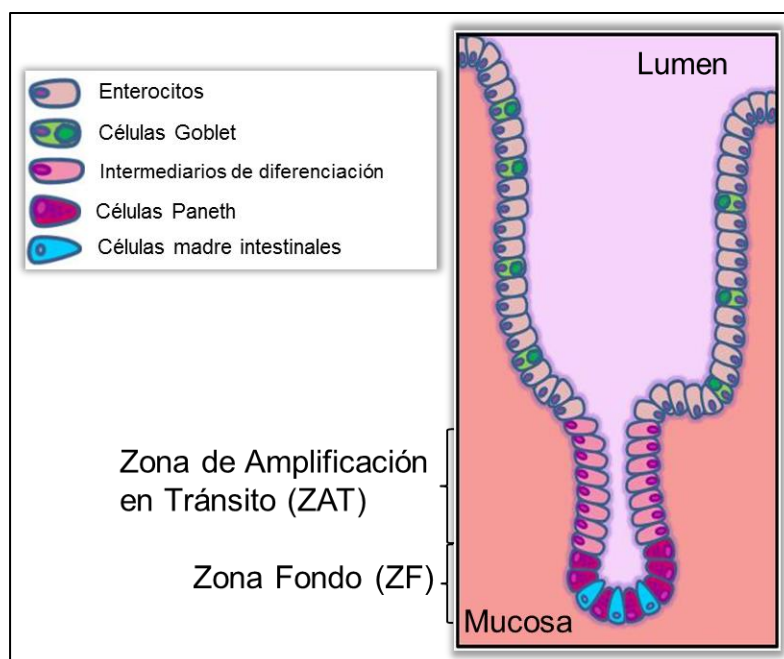
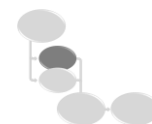


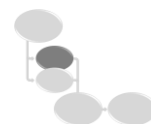
Figura 1.2: Representación gráfica de la cripta intestinal.

En otras patologías inflamatorias intestinales, como la Enfermedad de Crohn, se han estudiado las células de Paneth en su función reguladora de la microbiota ^[257-259]. En dichos trabajos se evidenció una disminución de la expresión de DEFA5 y, a raíz de ello, el desbalance producido en la microbiota exacerbó la inflamación.

En el caso de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) secundaria al trasplante de médula ósea en modelos animales, por su parte, las células de Paneth y las células madre constituyen el principal blanco celular de la apoptosis y no se recuperan en el curso de la patogénesis ^[260-262].

En cuanto a las células blanco en el rechazo postTxI, no hemos encontrado demasiadas contribuciones. Fishbein y su equipo ^[263] publicaron un estudio en el cual se muestra, en pacientes TxI con rechazo leve, una disminución en el número de células endocrinas y sus progenitores.

Por lo antes dicho, en este trabajo nos propusimos estudiar cuáles son los blancos celulares primarios del RCA y si las células de Paneth o las células madre intestinales están afectadas en número y funcionalidad durante la evolución de éste proceso inmunológico.



Materiales y métodos

I-Pacientes

En el presente estudio, fueron incluidos pacientes sometidos a TxI durante el período 2006-Agosto de 2017. El protocolo cuenta con la aprobación del Comité de Ética Institucional (DDI (1125) 511) y los pacientes han otorgado el correspondiente consentimiento de participación en el mismo. Los detalles del procedimiento, las terapias inmunosupresoras aplicadas y el seguimiento de los pacientes en el posTxI fueron publicados con anterioridad y explicadas de forma simplificada en la Introducción general ^[167, 264].

Durante la endoscopia de control para el monitoreo del injerto, se obtienen de 3 a 5 biopsias para el diagnóstico histopatológico y 1 biopsia para los estudios de expresión génica.

Para los distintos análisis, se seleccionaron y clasificaron retrospectivamente las biopsias en los que constituyeron nuestros grupos de trabajo:

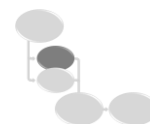
- **Normal (TxIN):** No presenta evidencia histológica de RCA u alguna otra afección. A su vez, el paciente debe haber estado libre de síntomas clínicos, tales como diarrea, fiebre o dolor abdominal, 72 horas previas al procedimiento endoscópico.

Si las biopsias evidenciaban signos histológicos de rechazo celular agudo, fueron subclasificadas de acuerdo a la severidad del cuadro en:

- **Rechazo Leve (TxIRL)**
- **Rechazo Moderado (TxIRM)**
- **Rechazo Severo (TxIRS)**

Con el propósito de objetivar la selección, se estableció un riguroso *criterio de inclusión* de biopsias:

1. Las biopsias debían contar con un diagnóstico histológico inequívoco, realizado por un patólogo experto siguiendo los criterios internacionales establecidos en el VIII Simposio Internacional de Trasplante Intestinal realizado en Miami del año 2003 ^[213].
2. Las muestras deben estar precedidas de al menos dos biopsias sin alteraciones histopatológicas.



3. Las biopsias con evidencia de RCA leve y moderado deben corresponder al día del diagnóstico y no a una biopsia posterior al diagnóstico en la cual la modificación en el tratamiento no resultó.
4. El paciente del cual proviene la muestra no debe haber recibido ningún tratamiento adicional al régimen inmunosupresor correspondiente.

Las muestras compatibles con rechazo severo no cumplen de forma total los criterios antes mencionados. Esto se debe a que no se contaba con un número suficiente de muestras y las mismas presentan características diferentes a pesar de estar catalogadas bajo el mismo diagnóstico.

A modo de referencia, tanto en ensayos de expresión génica se han incluido biopsias de voluntarios sanos que fueron endoscópicamente evaluados para detección temprana y prevención de cáncer de colon (**C, Control**) (DDI (1251) 1914). Esto nos permitió evaluar el estado inmunológico del intestino en condiciones normales.

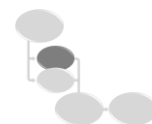
II-Inmunohistología

Para el diagnóstico histopatológico, las biopsias intestinales son fijadas en formol, deshidratadas y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Estos mismos bloques fueron utilizados para el presente protocolo de investigación.

Los detalles sobre los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la *Tabla 1.2a*.

Las secciones de tejido fueron desparafinizadas sumergiéndolas en xilol durante 5 min (2 veces), luego se realizan incubaciones de 1 min en soluciones alcohólicas de concentración decreciente y, finalmente, se colocan en H₂O destilada. Para la recuperación de antígenos, fueron tratadas con solución de citrato de sodio pH 6.0 a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó un bloqueo con solución de H₂O₂ al 3% por 15 min a temperatura ambiente (TA) seguido de una incubación con Protein Block (Biogenex, CA, USA) por 10 min para eliminar el pegado inespecífico de anticuerpos.

Los cortes fueron incubados a continuación con los anticuerpos primarios: anti-caspasa 3 clivada humana (1:50; Millipore, CA, USA), anti-IL22RA1 humano (1:50; Biorbyt, Cambridge, UK) durante 16 h a 4°C, anti-alfa defensina 5 humana (1:200; Clone 8C8; Abcam, Cambridge, UK) y anti-Ki-67 humana (1:200; Clone SP6; Novus Biologicals, Colorado, USA) durante 1 h a TA.



Las *detecciones inmunohistoquímicas* fueron llevadas cabo con anticuerpos biotinilados anti-porción Fc de conejo (1:200; Invitrogen, CA, USA) o anti- porción Fc de ratón (Biogenex, CA, USA) y peroxidasa de rabanito conjugada a estreptavidina (HRP; Biogenex). Como sustratos de la enzima se emplearon DAB pack de dos componentes (Biogenex) o Imm pact VIP (Vector, CA; USA), los cuales se ponen en contacto con el tejido hasta aparición de color.

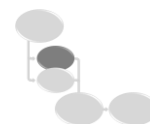
En el caso de las *detecciones por inmunofluorescencia*, se utilizó un anticuerpo biotinilado anti-porción Fc de conejo (1:200; Invitrogen) en conjunto con Cy3 conjugada a estreptavidina (1:200; Invitrogen) y un anticuerpo anti-porción Fc de ratón conjugado a Alexa-488 (1:200; Invitrogen). Para el montaje se utilizó el reactivo comercial Prolong Gold Antifade con DAPI (Life Technologies, CA, USA). La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio Axio FOT Zeiss y el análisis de las mismas se llevó a cabo con ImageJ 1.46r (NIH, USA).

III-Recuento de células en biopsias de intestino delgado

El número de células de Paneth, ISC IL22R⁺, ISC Ki67⁺ y cuerpos apoptóticos fueron determinados mediante el examen de un corte completo del taco de parafina que consta de 3 a 5 biopsias por paciente. Luego de realizadas las detecciones inmunohistoquímicas, un miembro del grupo de investigación obtuvo fotografías de todas las criptas del corte; mientras que otro de ellos realizó el recuento con total desconocimiento del diagnóstico asociado a cada muestra. Las criptas fueron divididas en dos zonas: **la zona del fondo (ZF) y la zona de amplificación en tránsito (ZAT)** (*Figura 1.2*). La ZF se corresponde con la ubicación de las células de Paneth (DEFA5⁺). La ZAT, por su parte, comprende las células entre ZF y la monocapa epitelial de células diferenciadas de las vellosidades intestinales. A los fines de este trabajo, definimos como ISC a las células IL22R⁺ o Ki67⁺ que se encuentran de forma intercalada con las células de Paneth en ZF. Se informaron el número de cuerpos apoptóticos/10 criptas y el número de ISC/10 criptas positivas para células de Paneth.

IV-Análisis de la expresión génica

Las muestras fueron embebidas en RNAlater (Ambion, Austin, USA) inmediatamente después de la toma mediante endoscopia y almacenadas a -70°C para la extracción del RNA total. Éste fue obtenido mediante el kit comercial RNASpin Mini (GE Healthcare, Miami, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración del material obtenido fue medida mediante un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop (Thermo Scientific). La transcripción reversa



fue realizada sobre 500 ng del RNA total extraído utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y el termociclador MJ Mini (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Los detalles de los pacientes incluidos se hallan en la *Tabla 1.2b*. Por su parte, los genes evaluados y los pares de cebadores correspondientes están listados en la *Tabla 1.3*.

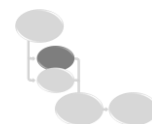
La PCR cuantitativa se llevó a cabo con SYBR Green PCR Mix (Life Technologies) utilizando el ciclador iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El programa consistió de 40 ciclos y cada uno de ellos en un paso de anillado de primers y amplificación a 60°C (1 min) y otro de desnaturalización a 95°C (15 seg). La concentración final de cada primer en la mezcla de reacción fue de 1µM y se utilizaron 10µl de una dilución 1.20 del cDNA obtenido como templado por reacción.

Se utilizó como referencia el gen beta-actina y el incremento en la expresión se calculó mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (o $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Este método de cuantificación relativa describe el cambio en la expresión de un dado gen en relación al nivel de ese mismo gen en grupo denominado control [265]. En nuestro caso, la expresión de los distintos genes evaluados fue relativizada al valor promedio de expresión obtenido para el grupo control (no trasplantados). A modo de ejemplo, el cálculo del cambio en los niveles de expresión de *DEFA5* en el grupo TxIRL sería el siguiente: se realiza, en primera instancia, la diferencia de ciclos necesarios para alcanzar el umbral o *threshold* (Ct) del gen de *DEFA5* y el gen de beta-actina de una muestra del grupo TxIRL obteniéndose el $\Delta Ct^{DEFA5 \text{ TxIRL}}$. Para el grupo control, se calculan de la misma manera los Ct s individuales de cada muestra y luego se promedian para obtener el $\Delta Ct^{DEFA5 \text{ CtrlProm}}$. Posteriormente se realizó la resta de los ΔCt ($\Delta Ct^{DEFA5 \text{ TxIRL}} - \Delta Ct^{DEFA5 \text{ CtrlProm}}$), dando lugar al $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, la introducción de este valor en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nos da como resultado el número de veces que se expresa *DEFA5* en el grupo TxIRL.

V-Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante los test de Kruskal-Wallis con post test de Dunn y el U de Mann-Whitney cuando más de dos grupos o sólo dos fueron analizados, respectivamente.

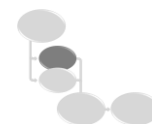
La evaluación de las dos zonas de la cripta provenientes de la misma muestra se realizó mediante la prueba *t* apareada.



Los análisis estadísticos de variables cuantitativas se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 5.01 (San Diego, USA); mientras que, el análisis de las variables cualitativas se realizó con IBM Statistical Package for Social Science (SPSS) v23 aplicando el test Chi-cuadrado.

a) Muestras para inmunohistología						
Categoría	Variables	TxIN (n=16)	TxIRL (n=9)	TxIRM (n=13)	TxIRS (n=6)	P-valor
Edad Receptor al momento de la Bx (años)		21 (2-48)	16 (2-35)	23 (4-49)	17 (2-48)	0.75
Género receptor	M/F	13/3	8/1	8/5	4/2	0.43
Edad del injerto al momento de la Bx (años)		17 (0.6-42)	14 (0.5-36)	16 (2-43)	16 (1-42)	0.94
Género donante	M/F	9/7	7/2	6/7	4/2	0.66
Días post-trasplante		344 (5-3530)	672 (34-3206)	347 (5-1230)	764 (17-3334)	0.62
Inmunosupresión	Tac	1	2	1	0	0.09
	Tac/ corticoides	6	2	6	1	
	Tac/Sir	1	2	0	2	
	Tac/MMF	0	2	1	0	
	Tac/Sir/corticoides	5	0	1	2	
	Tac/MMF/corticoides	3	1	4	1*	
Tipo de ITx	Aislado/ TxMVM	15/1/0	9/0/0	13/0/0	5/0/1	0.22
Colon	Nativo/ Trasplantado	13/3	9/0	9/4	5/1	0.33
Cuerpos apoptóticos/ 10 criptas		1 (0-1)	8 (6-10) †	10 (6-20) †	11 (10-12) †	0.00
b) Muestras para análisis de expresión génica						
Categoría	Variables	TxIN (n=5)	TxIRM (n=6)		P-valor	
Edad Receptor al momento de la Bx (años)		21 (7-48)	15 (3-48)		0.46	
Género receptor	M/F	4/1	4/2		0.62	
Edad del injerto al momento de la Bx (años)		11(4-20)	7 (1-20)		0.52	
Género donante	M/F	4/1	4/2		0.62	
Días post-trasplante		619 (55-1347)	683 (51-1196)		1.00	
Inmunosupresión	Tac	0	0		0.52	
	Tac/ corticoides	2	3			
	Tac/Sir	1	0			
	Tac/MMF	0	0			
	Tac/Sir/corticoides	0	0			
	Tac/MMF/corticoides	2	3			
Tipo de ITx	Aislado/ TxMVM	5/0	6/0		-	
Colon	Nativo/ Trasplantado	5/0	5/1		0.34	
Cuerpos apoptóticos/ 10 criptas		1 (0-1)	7 (6-9) †		0.01	

Tabla 1.2: Descripción de los pacientes incluidos en el estudio. Bx, Biopsia; TxIN, trasplantado sin rechazo; TxIRL, trasplantado con rechazo leve; TxIRM, trasplantado con rechazo moderado; TxIRS, trasplantado con rechazo severo; Tac, tacrolimus; Sir, sirolimus; MMF, micofenolato; TxMMV, trasplante multivisceral modificado. †; diferente del grupo sin rechazo (TxIN). * Paciente tratado con timoglobulina durante un evento de rechazo.



GeneID	Símbolo	Descripción	Tipo Celular	Secuencia 5'→3'
NM_021010.2	DEFA5	Alfa- Defensina 5	CP	GGGAAGACAACCAGGACCTTGCTA GCGGCCACTGATTTACACACC
NM_000239.2	LYZ	Lisozima		GGGAATGGATGGCTACAGGGGAATC TCCCATAATCAGTGCTTCTGTCTCCAG
NM_003667.3	LGR5	Receptor 5 rico en leucine acoplado a proteína G	ISC	AAGGTGACAACAGCAGTATGGACGA GGCCTGGGGAAGGTGAACACT
NM_021258.3	IL22RA1	Subunidad alfa del Receptor de interleucina 22	ISC Otras	AGACACGGTCTACAGCATCG GTGGCTTGAGGGTAGTGTG

Tabla 1.3: Descripción de los genes evaluados y los cebadores utilizados en los análisis de expresión génica. CP, célula Paneth; ISC, Células made intestinales.

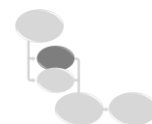
Resultados

I-Las células de Paneth permanecen intactas durante episodios de rechazo celular agudo

Las células de Paneth están localizadas en la ZF de las criptas intestinales y tienen un rol fundamental en la producción de péptidos antimicrobianos, participando así en el mecanismo de defensa ante patógenos y de regulación de la microbiota. Para evaluar si dichas células se ven afectadas por la apoptosis o pierden la funcionalidad durante un evento de rechazo, comparamos el número de células DEFA5⁺ mediante inmunohistología en cortes de biopsias intestinales normales y con evidencias de RCA leve, moderado y severo.

Como se observa en la *Figura 1.3A-D*, en todos los grupos evaluados pudieron detectarse células DEFA5⁺ (verde) las cuales se destacan de los núcleos teñidos de azul. El valor promedio de células de Paneth cada 10 criptas fue de $3,7 \pm 0,8$, $3,8 \pm 1,0$ y $3,2 \pm 1,1$ para los grupos TxIN (n=13), TxIRL (n=9) y TxIRM (n=12) respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ellos (*Figura 1.3E*). En el caso de las muestras TxIRS (n=6), la disminución del número de células de Paneth es notable aunque no estadísticamente diferente del resto de los grupos. El valor medio obtenido fue $1,8 \pm 1,8$ células de Paneth/10 criptas. Esta reducción es consecuencia de la presencia de 3 muestras con rechazo severo exfoliativo, donde se encontraron escasas o nulas criptas remanentes. No obstante, algunas de las muestras diagnosticadas con el RCA de máxima severidad y que presentan numerosas ulceraciones, más no pérdida total del epitelio vellositario y críptico, exhiben una cantidad de células de Paneth comparable al grupo TxIN.

Si bien la detección de DEFA5 por inmunohistoquímica es indicativa de que las Paneth son capaces de sintetizar este péptido antimicrobiano, utilizamos qPCR para evaluar si el nivel de expresión del gen que codifica para esa proteína (*DEFA5*) se ve alterada durante el RCA.



También adicionamos el análisis de la expresión del gen que codifica para la proteína lisozima (LYZ), la cual también posee funciones antimicrobianas. Sólo se utilizaron biopsias pertenecientes al grupo TxIN (n=5) y TxIRM (n=6), dado que el grupo TxIRL evidenciaría un valor intermedio y el grupo TxIRM por su heterogeneidad no brindaría información valiosa.

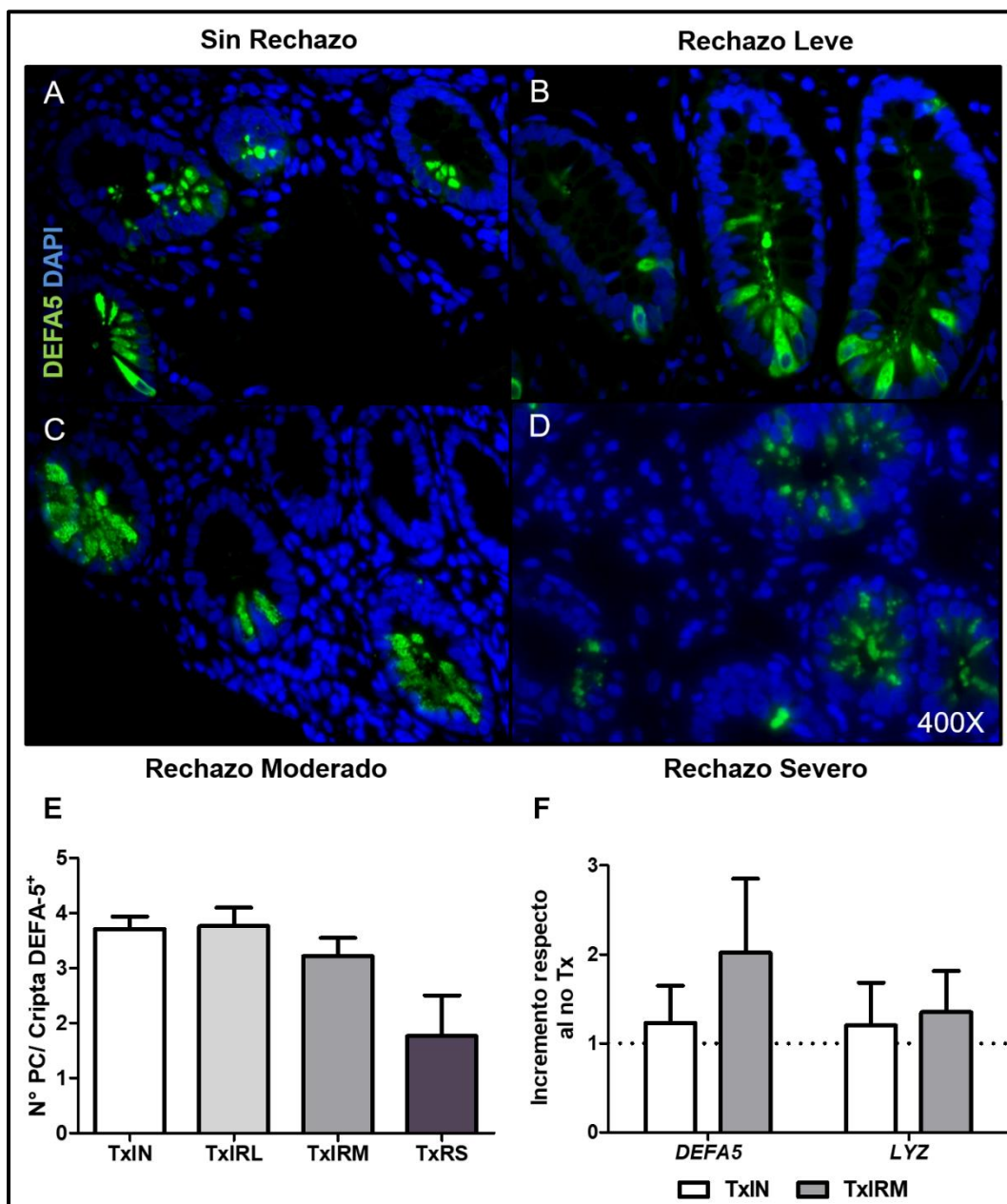
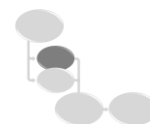


Figura 1.3: Células de Paneth en el RCA posTxI. (A-D) Imágenes representativas de la detección de células de Paneth por inmunofluorescencia (DEFA5+, verde) en biopsias de pacientes trasplantados con (A) histología normal (TxIN, n=13); (B) rechazo leve (TxIRL, n=9); (C) rechazo moderado (TxIRM, n=11); (D) rechazo severo (TxIRS, n=6). Magnificación 400X. (E) Número de células de Paneth por cripta DEFA5+. (F) Nivel de expresión génica de DEFA5 y LYZ en TxIN (n=5) y TxIRM (n=6). La expresión de cada gen fue normalizada usando β -actina. El incremento fue calculado a través del método $\Delta\Delta Ct$, usando el promedio de los controles no Tx como referencia. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn o la prueba U de Mann-Whitney a una cola según corresponda.



Se utilizó como referencia el grupo no trasplantado o grupo control (n=4), por lo que su nivel de expresión se representa en la *Figura 1.3F* como una línea punteada en y=1.

Como se puede observar en la *Figura 1.3F*, los niveles de expresión de *DEFA5* y *LYZ* en TxIRM son comparables a los de TxIN. Incluso puede detectarse una tendencia creciente en el nivel de *DEFA5* en el grupo TxIRM. También es importante destacar que dichos niveles no difieren a los de los voluntarios que no han sido sometidos a trasplante, descartando así un efecto del entorno inmunogénico asociado al trasplante o de la inmunosupresión sobre la función de estas células.

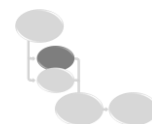
Estos últimos resultados apoyan a los obtenidos mediante inmunohistoquímica y sugieren que las células de Paneth permanecen intactas en número y función aún durante episodios de RCA moderado. Además, muestran que, incluso en casos más severos con un gran deterioro de la estructura de la mucosa intestinal, pueden hallarse células de Paneth funcionales.

II-La zona de amplificación en tránsito se ve más afectada que la zona del fondo de la cripta por el fenómeno de apoptosis secundario al rechazo celular agudo

Tradicionalmente, el diagnóstico histológico de rechazo intestinal se realiza sobre cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina para diferenciar estructuras basófilas y acidófilas (*Figura 1.4A-C*). Un aspecto importante del criterio de diagnóstico es el número de cuerpos apoptóticos cada 10 criptas (*Tabla 1.1*) ^[213]. Ese valor es informado y, en conjunto con otros hallazgos histológicos, determina el estado del injerto. Sin embargo, cuando se realiza este conteo, no se repara en distinguir en qué zona de la cripta se producen ni qué tipo celular fue el afectado. En este trabajo, se utilizó un anticuerpo anti-CASP3 clivada como marcador de apoptosis para determinar qué zona de la cripta es más afectada por la apoptosis y si las células de Paneth *DEFA5*⁺ co-expresan dicho marcador. Como se demostró en el apartado anterior, en nuestras condiciones de trabajo no se detectó una disminución del número de células de Paneth en los grupos de estudio. Por lo que, fue posible utilizar este tipo celular para diferenciar la ZF de la ZAT.

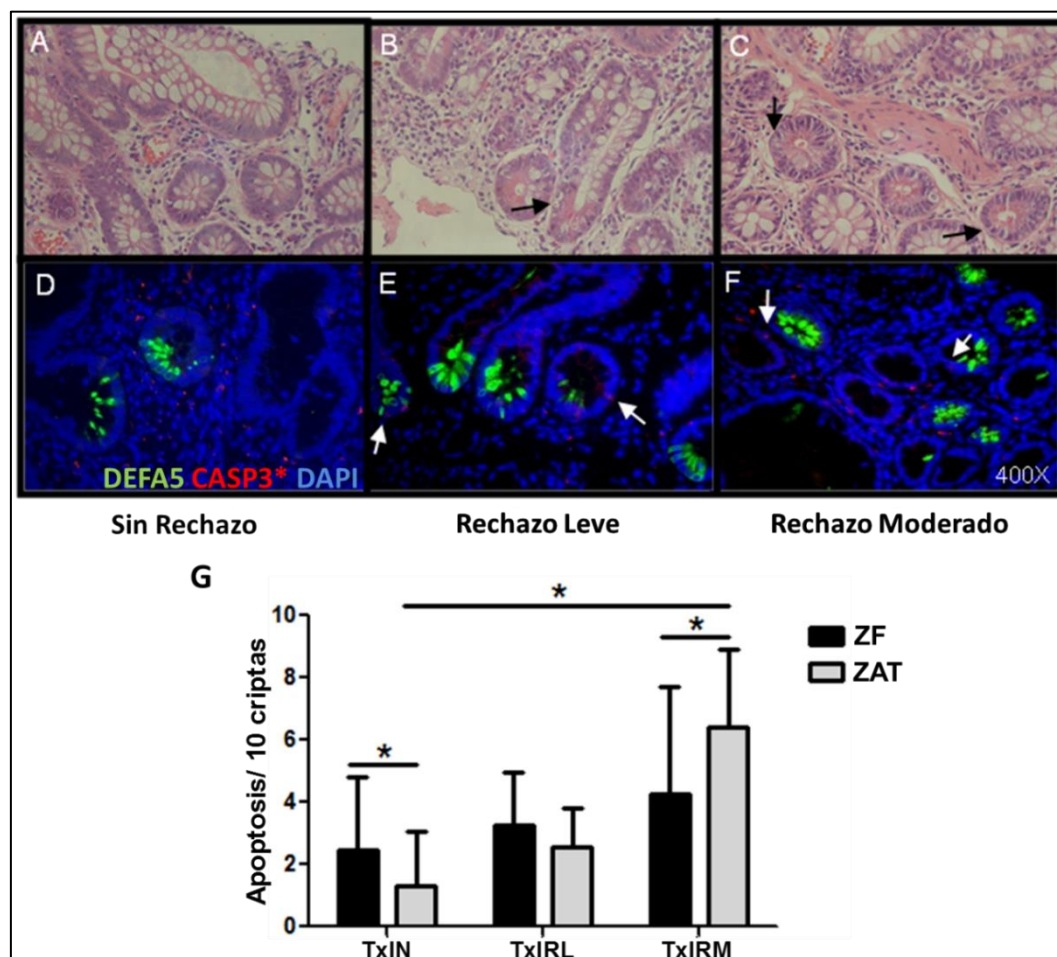
Para tal fin, se seleccionaron entonces 4 muestras de cada grupo (TxIN, TxIRL, TxIRM) y se co-detectó en ellas *DEFA5* (verde) y *CASP3* (rojo) mediante inmunofluorescencia.

En concordancia con los resultados previos, no observamos co-localización de *CASP3* con *DEFA5*. Tampoco se hallaron células en estadios tempranos de apoptosis. Es decir, aquellas células positivas para *CASP3* que aún no presenten disrupción de la membrana o fragmentación del núcleo. No obstante, pudimos detectar cuerpos apoptóticos (rojo), los



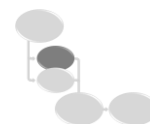
cuales son indicados en la *Figura 1.4D-F* con flechas blancas. Estos fueron contabilizados teniendo en cuenta si se encontraban en la zona rica en células de Paneth (ZF) o en la zona de amplificación en tránsito (ZAT) (*Figura 1.4G*). En la ZF, los valores medios obtenidos fueron $2,5 \pm 1,2$, $3,2 \pm 0,8$ y $4,2 \pm 2,0$ para TxIN, TxIRL y TxIRM respectivamente.

Figura 1.4: Apoptosis en las distintas zonas de la cripta intestinal durante el RCA. (A-C) Tinción con hematoxilina-eosina de biopsias de pacientes trasplantados con (A) histología normal (TxIN); (B) rechazo leve



(TxIRL); (C) rechazo moderado (TxIRM). Los cuerpos apoptóticos están indicados con flechas negras. Magnificación 400X. (D-F) Detección por inmunofluorescencia de caspasa 3 clivada (CASP3*, rojo, flechas blancas) y células de Paneth (DEFA5*, verde) en biopsias de pacientes trasplantados (D) TxIN; (E) TxIRL; (F) TxIRM. Magnificación 400X. (G) Número de apoptosis por 10 criptas en la zona del fondo (ZF) o de amplificación en tránsito (ZAT). Los valores se muestran como Media \pm EEM. Los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn y el análisis por zona mediante la prueba *t* apareada. **P* < 0.05

Como era de esperar, se observó una tendencia creciente en el número de cuerpos apoptóticos conforme la severidad del RCA aumenta. Sin embargo, dichos incrementos no resultaron significativos. En la ZAT, se evidenció el mismo sesgo pero el incremento de la apoptosis fue estadísticamente significativo entre los grupos extremos ($p=0,028$). En este caso, los valores medios obtenidos fueron $1,3 \pm 0,9$, $2,6 \pm 0,6$ y $6,4 \pm 1,4$ para TxIN, TxIRL y TxIRM respectivamente. En el grupo con RCA moderado, el número de apoptosis en ZAT fue mayor que en la ZF ($p=0,034$).

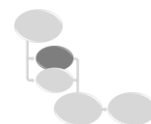


Estos resultados indican que el daño producido por la apoptosis en eventos de RCA de distinta severidad está mayormente dirigido a la ZAT de la cripta intestinal.

III-Las células madre intestinales no se ven alteradas durante eventos de rechazo celular agudo

Las ISC, como se ha mencionado anteriormente, son el otro grupo de células intestinales cuyo nicho es el fondo de la cripta. Hasta el momento, no se ha descrito su rol en la regeneración del epitelio dañado como resultado del RCA. Aquí, nos propusimos evaluar el estado de este particular grupo celular durante eventos de RCA. Las células madre intestinales expresan el receptor de IL-22 (IL-22R), por lo que, se utilizó un anticuerpo anti-IL22R para detectarlas y, a su vez, el anticuerpo anti-DEFA5 para diferenciarlas de las células de Paneth mediante inmunohistoquímica. Ha sido reportado en estudios con ratones que no sólo las ISC, sino también las células de Paneth, expresan el IL-22R [260]. Sin embargo, en nuestros grupos de estudio, no se observó co-localización de ambos marcadores pero si células positivas para el IL-22R (violeta) intercaladas con las células de Paneth (marrón). Las células IL-22R⁺ fueron identificadas en todos los grupos evaluados (*Figura 1.5A-D*). El número de células IL-22R⁺ por cripta DEFA5⁺ no varió significativamente entre los grupos, siendo la media para cada uno de ellos: TxIN 16,8 ± 1,4; TxIRL 11,5 ± 3,7; TxIRM 16,4 ± 1,5 y TxIRS 10,0 ± 6,1 (*Figura 1.5E*). Las aclaraciones sobre el grupo con RCA severo antes realizadas, son aplicables también en este caso.

Con el objeto corroborar estas observaciones, se evaluó el nivel de expresión del IL-22RA1 mediante qPCR en los grupos TxI sin rechazo (n=5) y con RCA moderado (n=6) utilizando como referencia al grupo control (y=1). No se evidenció un detrimento en la expresión de IL-22RA1 en TxIRM en comparación con el grupo sin rechazo, por el contrario parece existir una tendencia de que dicha expresión aumente cuando se incrementa la injuria en la mucosa intestinal. (*Figura 1.5F*). El receptor 5 rico en repeticiones de Leucina acoplado a proteína G (LGR5) es el marcador por excelencia de las ISC. Luego de haber intentado utilizar anticuerpos anti-LGR5 para la detección de ISC mediante técnicas de inmunohistología sin éxito, se decidió incorporar la medida de la expresión del gen que codifica dicho receptor. Los niveles de *LGR5* en TxIRM fueron comparables al del grupo TxIN y no presentaron variación respecto a los controles sin trasplante (*Figura 1.5F*). **Estos resultados muestran que las ISC**



están presentes durante eventos de RCA, sugiriendo que estas células no constituyen un blanco del mismo.

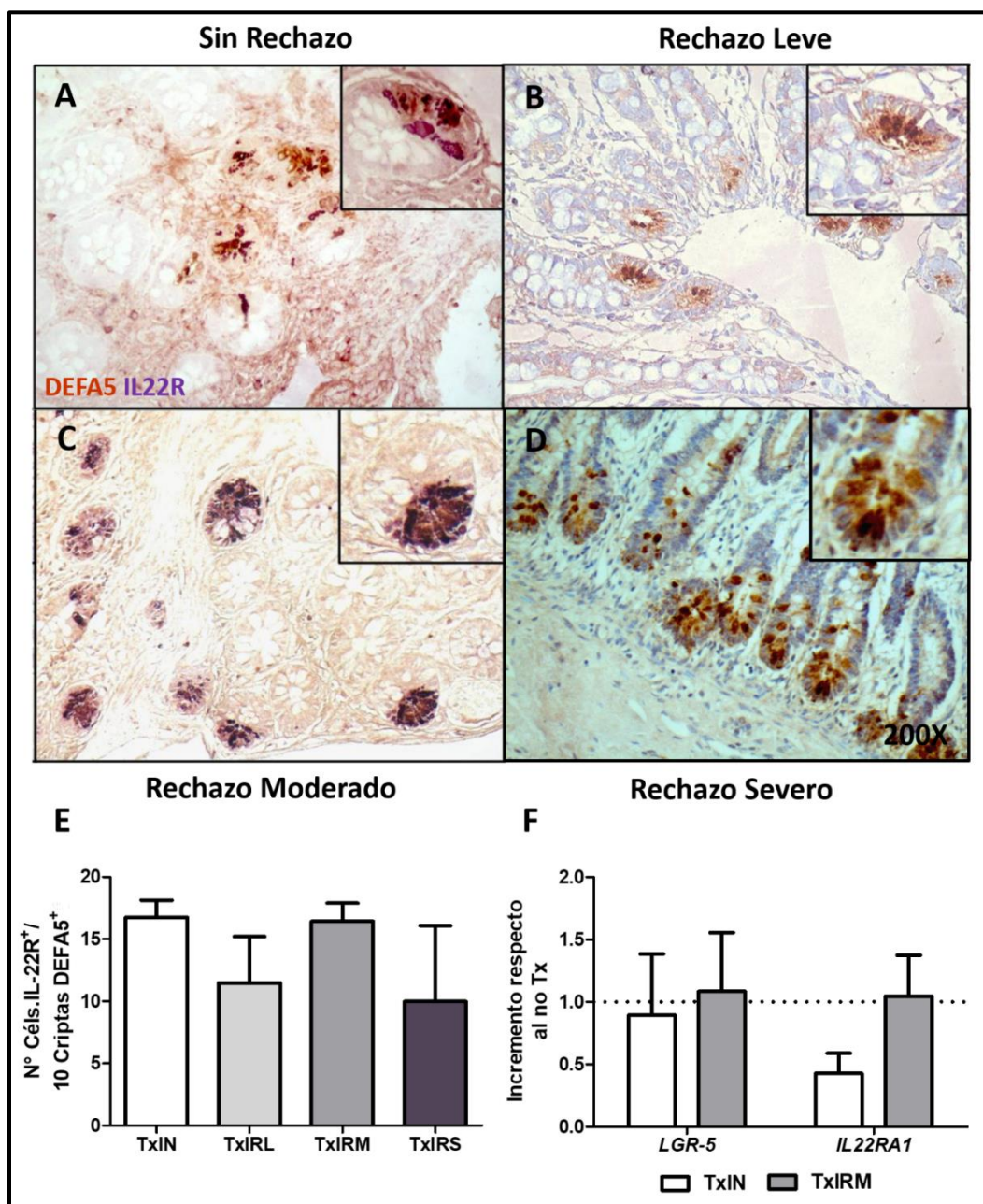
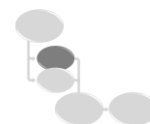


Figura 1.5: Células madre intestinales (ISC) IL-22R⁺ en el contexto del RCA. (A-D) Detección inmunohistoquímica de IL-22R (violeta) y células de Paneth (marrón) en biopsias de pacientes trasplantados con (A) histología normal (TxIN, n=13); (B) rechazo leve (TxIRL, n=9); (C) rechazo moderado (TxIRM, n=12); (D) rechazo severo (TxIRS, n=5). Magnificación 200X. Células IL-22R⁺ intercaladas a las células de Paneth fueron consideradas como ISC (línea punteada) (E) Número de ISC IL-22R⁺ cada 10 criptas DEFA5⁺. (F) Nivel de expresión génica de LGR5 e IL-22RA en los grupos TxIN (n=5) y TxIRM (n=6). La expresión de cada gen fue normalizada usando β -actina. El incremento fue calculado a través del método $\Delta\Delta Ct$, usando el promedio de los controles no Tx como referencia. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn o la prueba U de Mann-Whitney a una cola según corresponda.



IV-La capacidad proliferativa de las células madre no se ve perjudicada durante el rechazo celular agudo

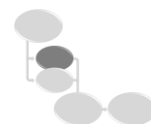
El epitelio intestinal requiere constante renovación debido a que está expuesto al medioambiente luminal. Este proceso implica la proliferación continua de las ISC en la base de la cripta y la subsecuente migración de dichas células a la superficie de las vellosidades [253]. Ante un evento de injuria, este proceso que resulta de vital importancia para el mantenimiento de la barrera intestinal y la función del órgano, se verá afectado y por ende se alterará la arquitectura de la barrera mucosa. Para evaluar si las ISC son capaces de proliferar en el contexto del RCA, se detectaron y contaron las células positivas para el marcador de proliferación Ki-67 que estuvieran intercaladas con las células de Paneth. Ki-67 es una proteína nuclear que se encuentra presente en todas las fases activas del ciclo celular, más no en estado de arresto o G₀. Dado que los núcleos toman el color azul del DAPI, aquellos que a su vez sean Ki-67⁺ se verán de color fucsia por solapamiento con el color rojo de la tinción específica.

Fue posible la detección de ISC Ki-67⁺ en todas las biopsias analizadas, independientemente de la severidad del rechazo (*Figura 1.6A-D*). El recuento de las mismas arrojó que las medias de los grupos TxIN (n=13), TxIRL (n=7) y TxRM (n=11) fueron comparables ($24,0 \pm 2,8$; $27,1 \pm 3,2$; $20,1 \pm 3,2$; respectivamente), como se observa en la *Figura 1.6E*. En el caso del RCA severo (n=5), el valor medio fue significativamente menor ($8,3 \pm 6,1$; p= 0,077). No obstante, las ISC Ki-67⁺ en aquellas muestras que poseen criptas remanentes están presentes en gran número, evidenciándose esto en la *Figura 1.6D*.

La propiedad proliferativa de las ISC permanece intacta durante eventos de RCA y éstas constituyen un blanco celular fundamental para impulsar procesos regenerativos.

V- Rechazo celular agudo en trasplante intestinal versus otras patologías inflamatorias intestinales

Tanto en el RCA como en la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), el daño epitelial se produce debido a la acción de los linfocitos T [229]. Histológicamente, también comparten ciertas características como la apoptosis a nivel de las criptas. Sin embargo, ha sido reportado que los blancos tempranos de la apoptosis en EICH son las células del fondo de las criptas [260-262]. Por ello, nos resultó de interés realizar una comparación de estas patologías de base inmunológica.



Para tal fin, se seleccionaron 6 muestras con evidencia de EICH a nivel intestinal (duodeno o íleon) provenientes de pacientes con trasplante de médula ósea tratados en nuestra institución. Estas fueron clasificadas según la severidad de la patología en grados que van del 1 al 4 y se les realizaron las mismas tinciones inmunohistológicas que al resto de la muestra de TxI. Los resultados muestran un daño notable en la zona del fondo de las criptas aún en muestras con signos leves de EICH, lo cual concuerda con la literatura (Figura 1.7).

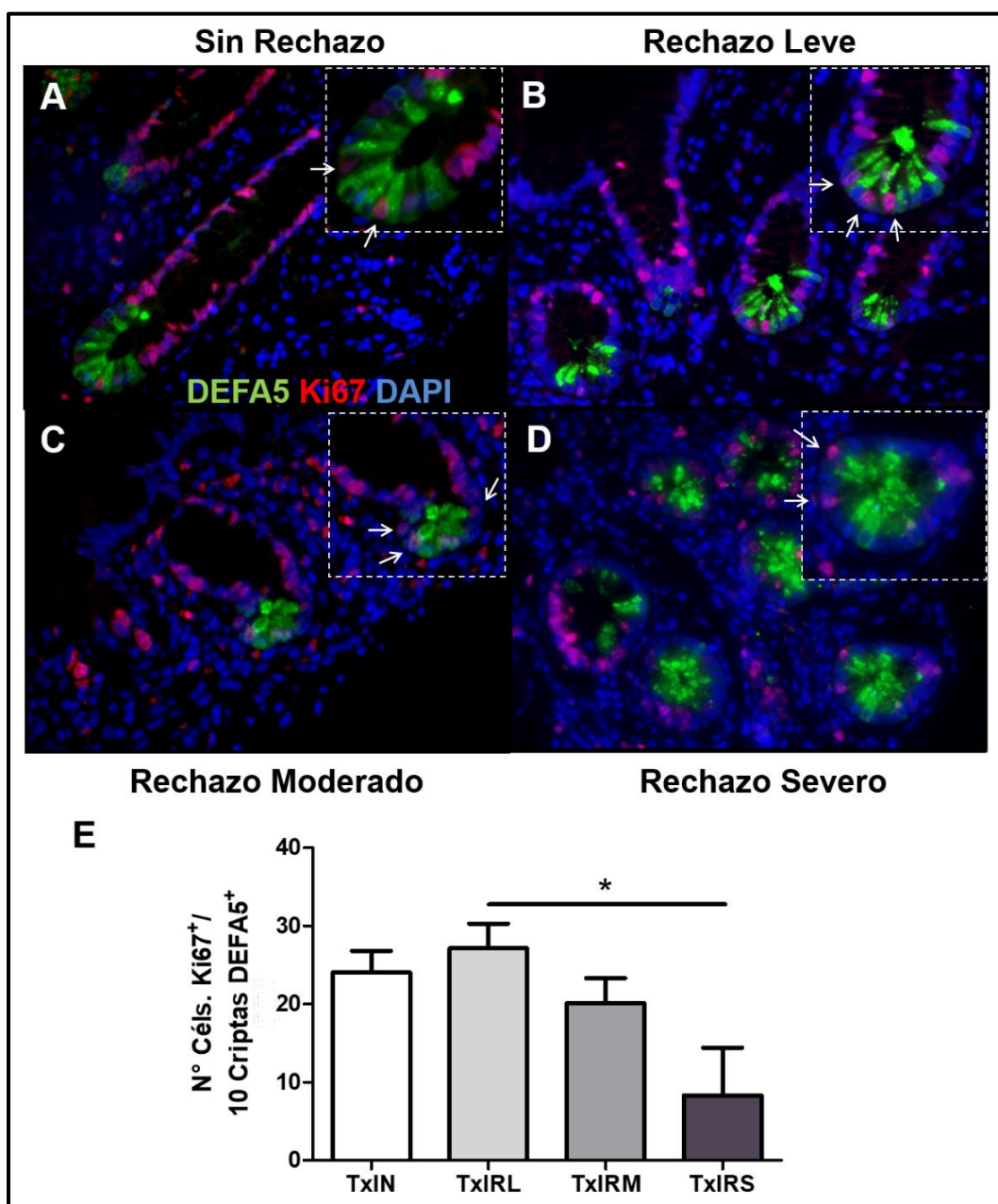
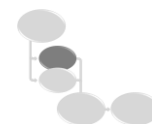


Figura 1.6: Capacidad proliferativa de las células madre intestinales. (A-D) Detección por inmunofluorescencia de Ki-67 (rojo) y células de Paneth (DEFA5+, verde) en biopsias de pacientes trasplantados con (A) histología normal (TxIN, n = 13); (B) rechazo leve (TxIRL, n=9); (C) rechazo moderado (TxIRM, n=12); (D) rechazo severo (TxIRS, n=5). Magnificación 400X. Células Ki-67+ intercaladas a las células de Paneth fueron consideradas como ISC proliferativas. (E) Número de ISC Ki-67+ cada 10 criptas DEFA5+. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. *P < 0.05.



Se pudieron detectar células de Paneth (DEFA5⁺) aisladas sólo en muestras de grado 1, mientras que las muestras de mayor severidad presentan un gran deterioro de la estructura de la mucosa (*Figura 1.7A-C*). Respecto a las ISC, la observación es prácticamente la misma. En las muestras de grado 1, donde la arquitectura del eje cripta-vellosidad parece intacta, se pudieron identificar algunas pocas células IL-22R⁺ que presentan baja o nula capacidad proliferativa (*Figura 1.7D-E*) comparadas con las muestras de TxI incluidas en el trabajo, incluso aquellas con RCA severo.

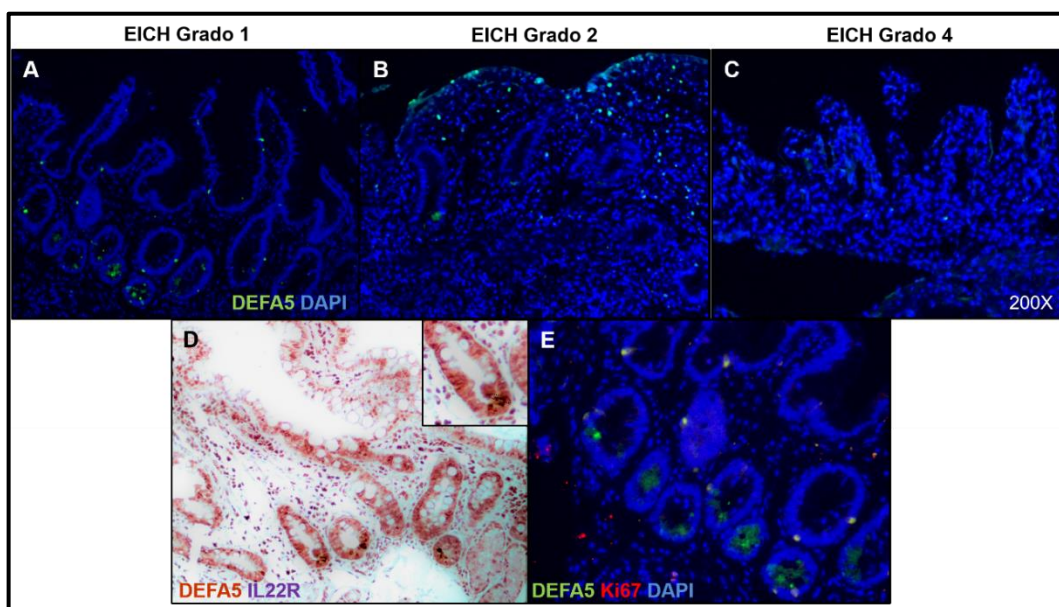
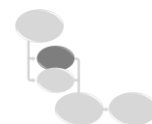


Figura 1.7: Células de Paneth e ISC en la enfermedad de injerto contra huésped. (A-C) Detección por inmunofluorescencia de células de Paneth (DEFA5⁺, verde) en biopsias intestinales de pacientes sometidos a trasplante de médula ósea que presentan A) EICH Grado 1 (íleon); B) EICH Grado 2 (íleon); C) EICH Grado 4 (duodeno). D) Detección inmunohistoquímica de IL22R (violeta) y células de Paneth (marrón) en EICH grado 1. E) Detección por inmunofluorescencia de células Ki-67 (rosa) y células de Paneth (DEFA5⁺, verde). Las células Ki-67⁺ o IL-22R⁺ que estén intercaladas entre las células de Paneth son consideradas ISC. Estas imágenes son representativas de 6 pacientes analizados. Magnificación 200X.

La injuria por isquemia-reperfusión (IIR) en intestino da lugar, también, a daño a nivel epitelial^[266]. No obstante, este tipo de injuria no tiene raíz inmunológica. Se produce por acumulación de productos metabólicos ácidos a consecuencia del metabolismo anaerobio en ausencia de oxígeno, el desbalance de electrolitos ante una membrana permeable y la acumulación de hipoxantina que es sustrato de una enzima que produce especies reactivas del oxígeno en la fase de reperfusión^[267]. Grootjans y colaboradores, han mostrado cierta susceptibilidad de las células de Paneth a este tipo de injuria en modelos animales y en humanos^[268]. Entonces, decidimos comparar el estado de las células de Paneth y las ISC ante este mecanismo patológico diferente al del RCA.



Para ello, se seleccionaron las biopsias intestinales de la primera semana postTxI de 7 pacientes que presentaban signos de IIR de distinta severidad. La graduación del daño en IIR está dada por la *escala de Park* donde: (1) espacio subepitelial (ubicado en la punta de la vellosidad); (2) espacio subepitelial extendido (compromete toda la vellosidad); (3) erosión de enterocitos; (4) vellosidades denudadas; (5) pérdida de vellosidades; (6) infarto de criptas; (7) infarto mucoso; (7) infarto transmural [269].

Luego de aplicar las mismas tinciones inmunohistológicas que a las muestras de TxI con rechazo, se eligieron imágenes representativas agrupadas en la *Figura 1.8*.

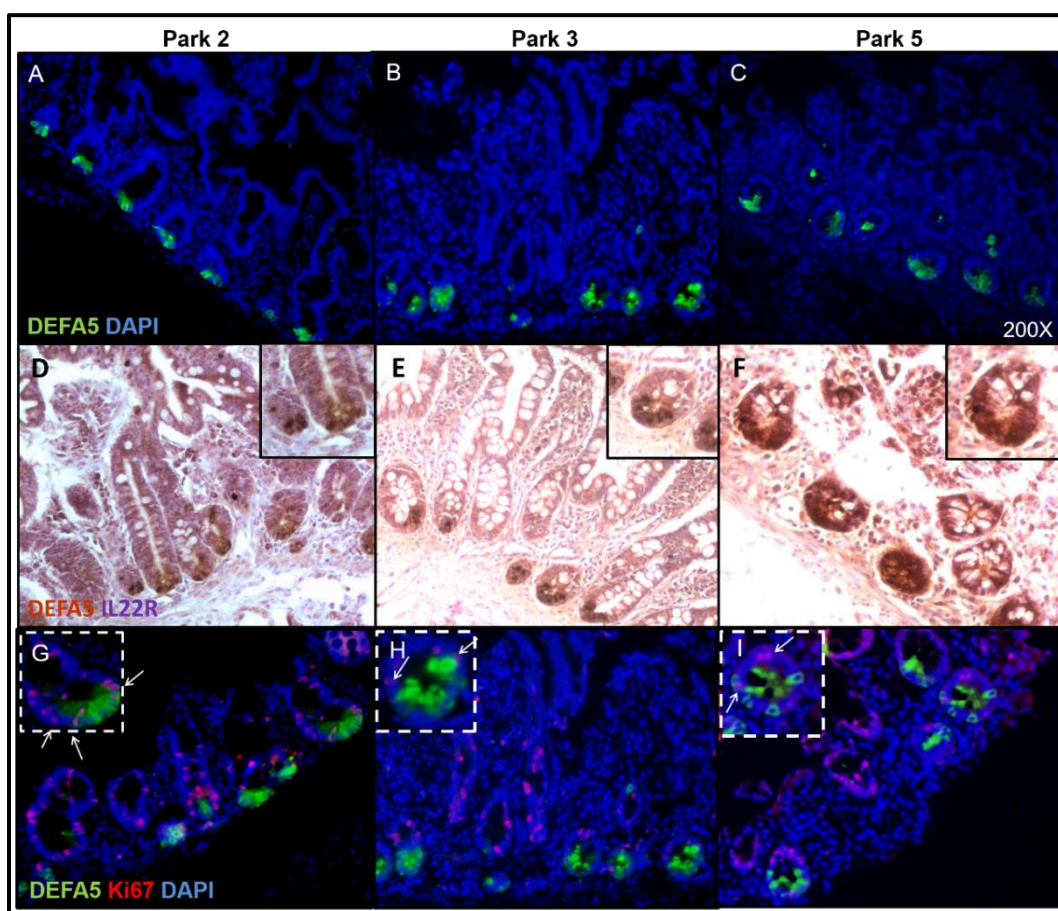
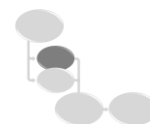


Figura 1.8: Células de Paneth e ISC en injuria por isquemia-reperfusión. (A-C) Detección por inmunofluorescencia de células de Paneth (DEFA5⁺, verde) en biopsias intestinales ileales de pacientes sometidos a trasplante intestinal con signos de IIR con A) Park 2; B) Park 3; C) Park 5. (D-F) Detección inmunohistoquímica de IL-22R (violeta) y células de Paneth (marrón): D) Park 2; E) Park 3; F) Park 5. (G-I) Detección por inmunofluorescencia de células Ki-67 (rosa) y células de Paneth (DEFA5⁺, verde): G) Park 2; H) Park 3; I) Park 5. Las células Ki-67⁺ o IL-22R⁺ que estén intercalas entre las células de Paneth son consideradas ISC. Estas imágenes son representativas de 7 pacientes analizados. Magnificación 200X.

De forma contraria a lo observado para el caso de EICH, las células de Paneth se encuentran conservadas (*Figura 1.8A-C*). Las células madre también permanecen inalteradas así como su capacidad proliferativa, aún para las muestras con mayor índice de Park que encontramos



en nuestra serie de TxI (*Figura 1.8D-I*). Si bien estos hallazgos contradicen a lo reportado en la literatura, son coherentes a lo esperado para una muestra de Park 5, donde la injuria se concentra a nivel de las vellosidades y no de las criptas. Es importante destacar y lo ampliaremos en la discusión, que si bien el intestino es un órgano susceptible a isquemia y al posterior daño por reperfusión, en la clínica es infrecuente ver daño mayor al correspondiente al Park 5. La recuperación es completa para la biopsia que se obtiene la primer semana, lo cual avala lo hallado en este estudio.

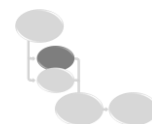
Discusión

En los últimos años se incrementó la supervivencia de los procedimientos de trasplante que incluyen el intestino ha mejorado gracias a los avances técnicos de la cirugía de trasplante, al desarrollo de nuevas drogas inmunosupresoras y a la aplicación de mejores esquemas de inducción y mantenimiento ^[240, 270]. Sin embargo, la incidencia de RCA continúa afectando a la población trasplantada, siendo la primera causa de pérdida de injerto. Los especialistas en el área concuerdan en que el diagnóstico temprano de estos cuadros de rechazo resulta determinante para el tratamiento oportuno y, así, frenar la evolución natural, progresiva y letal del cuadro de rechazo ^[271].

Clásicamente se ha aceptado que el RCA es un proceso inmunológicamente complejo que involucra la aloreactivación de linfocitos T. Éstos provocan daño por citotoxicidad a nivel de mucosa y el endotelio, siendo el epitelio críptico el sitio donde más tempranamente se evidencia la injuria a nivel histológico ^[185]. La aparición de apoptosis celular, es el signo patognomónico de los eventos de RCA ^[213], a pesar de que también puedan producirse como resultado de infecciones virales.

Las células de Paneth y las células madre intestinales están afectadas en varias enfermedades inflamatorias, tales como la enfermedad de Crohn y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). También se ha sugerido que las células de Paneth son particularmente sensibles a la injuria por isquemia reperfusión (IIR) ^[268]. En el TxI, la cantidad de cuerpos apoptóticos en las criptas ha sido definida como indicador para el diagnóstico de RCA ^[213]. Sin embargo, el tipo celular afectado durante el RCA en sus distintos grados de severidad no se conoce hasta el momento.

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican por primera vez que las células de Paneth y las células madre permanecen intactas en número y funcionalidad aún en eventos de RCA severo. Esto sugiere que la zona del fondo (ZF) de la cripta no es el blanco inicial y principal



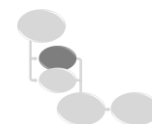
de la injuria producida en el RCA, como siempre se había sostenido. Además, demostramos que la TAZ es más susceptible que la ZF.

En concordancia con los resultados mencionados pero no publicados por Fishbein y colaboradores ^[263], no observamos una reducción en el número de células de Paneth en RCA leve. Además, incluimos biopsias con signos histológicos de RCA de mayor severidad en las cuáles se evidenció un leve detrimento en el número de células de Paneth sin significancia estadística. No obstante, el nivel de *DEFA5* se mantiene constante o levemente aumentado en TxIRM en comparación con biopsias TxI sin rechazo. Este incremento puede ser explicado como una estrategia compensatoria a la pérdida de la integridad de la barrera intestinal. Teniendo en cuenta esto, las células de Paneth pudieron ser utilizadas como marcador inequívoco del fondo críptico. El rechazo severo exfoliativo, es la forma más agresiva del RCA en TxI y se caracteriza por la pérdida total de las vellosidades y el deterioro masivo de las criptas. Dentro del grupo TxIRS, tres muestras poseen estas características y son la causa del detrimento de la media en el número de las células de Paneth. Mientras que, aquellas biopsias con diagnóstico de RCA severo por ulceración de la mucosa, poseen un número comparable al resto de los grupos evaluados.

Del mismo modo que para las células de Paneth, el número de células madre intestinales no disminuyó en biopsias con RCA leve o moderado en comparación al grupo TxIN. En estudios con modelos murinos, se ha determinado la existencia de dos tipos de células madre intestinales: las quiescentes y las proliferativas ^[272, 273]. A través del marcador de proliferación Ki-67 logramos identificar células madre proliferantes en la ZF aún en eventos de RCA moderado y severo. Por lo que, la células madre no se ven afectadas y conservan su capacidad proliferativa la cual resulta de suma importancia en el proceso de recambio y reparación de la barrera epitelial.

Por lo que, podemos considerar a la TAZ como blanco principal del RCA agudo mediado por células T, mientras que a zona del fondo permanece sin alteraciones y apta para garantizar el inicio de los procesos regenerativos. Estos hallazgos, además, son concordantes con lo que se observa en la fase de reparación del daño del rechazo en las biopsias de seguimiento. Durante la misma, las células madres generan nuevas células que inicialmente cubren la zona ulcerada a través de una monocapa epitelial para luego observar la regeneración de las vellosidades. Este proceso es comparable a la recuperación de la piel en un quemado, en la cual el folículo piloso actúa como sitio de inicio de la reparación epidérmica.

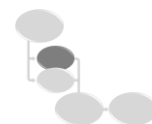
En contraposición a nuestros resultados, se ha reportado en enfermedad de injerto contra huésped, tanto en humanos como ratones, que las células constituyentes de la ZF se ven



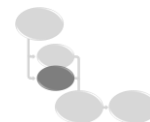
dañadas y su función se ve intensamente afectada ^[261, 274, 275]. No obstante, es posible que esta diferencia se deba a que la sección de intestino delgado utilizada para el análisis fue diferente. Las muestras de TxI consistieron exclusivamente en biopsias de íleon distal, mientras que en EICH se emplearon biopsias duodenales ^[275]. Además, el condicionamiento pre trasplante de células hematopoyéticas incluye altas dosis de quimioradioterapia que tiene efectos directos sobre el tracto intestinal (enteritis, por ejemplo) que se ven exacerbados durante EICH ^[276]. Este tipo de condicionamiento no se utiliza en pacientes que van a ser sometidos a TxI. Por último, si bien existe un principio básico de aloinmunidad como base de ambos procesos, pequeñas diferencias a nivel molecular o celular podrían tener una incidencia decisiva en el tipo de blanco celular. La identificación de patrones moleculares diferenciales, que puedan por ejemplo ser blanco de diferentes anticuerpos monoclonales, abre una nueva línea de trabajo de investigación con potencial futuro terapéutico.

El mecanismo clásico de RCA comprende la acción de linfocitos T citotóxicos que reconocen aloantígenos presentados por células epiteliales e inducen, en consecuencia, la apoptosis de la célula blanco ^[185]. Talmon y colaboradores ^[277] pudieron detectar células intactas positivas para caspasa3, así como también cuerpos apoptóticos en criptas intestinales. Nosotros, sólo fuimos capaces de detectar cuerpos apoptóticos con este marcador. Por lo tanto, la co-localización con marcadores para células de Paneth y células madre intestinales no fue posible.

En modelos experimentales de injuria por isquemia/reperfusión la co-localización de *CASP3* con *DEFA5* sí pudo ser documentada ^[268], sin embargo los mecanismos biológicos de este proceso difieren de los del TxI. A raíz de esto, nos propusimos evaluar el estado de las células constituyentes de la ZF de la cripta en muestras con signos de IIR secundaria al procedimiento del TxI. Nuestros resultados indican que no hay daño a nivel de las células de Paneth y las ISC. Esto puede deberse a que, en el trabajo publicado por Grootjans y colaboradores ^[268], la injuria en las células de Paneth se produce con una combinación específica de tiempo de isquemia y tiempo de reperfusión lo cual no se reproduce en forma exacta en el TxI. Además, teniendo en cuenta las características distintivas del órgano, en cada trasplante se tratan de minimizar los tiempos de isquemia. El máximo grado en la escala de Park hallado en nuestras muestras fue de 5, lo que se corresponde con destrucción total de las vellosidades sin evidencia de daño en las criptas. Es por ello que, en el 100% de los casos, se observa reparación *ad-integrum* de la mucosa y la mejora consistente en el comportamiento clínico, permitiendo el inicio de nutrición enteral del paciente trasplantado.



El proceso de inducción y ataque dirigido a ciertos blancos celulares durante el RCA es muy complejo y, probablemente, la disrupción epitelial no se deba solamente a la acción linfocitos T aloreactivos sobre los blancos celulares de la cripta sino que también pueden verse afectadas las células endoteliales. En ratones mutantes para la glutatión-peroxidasa 1 (Gpx1)/Gpx2, donde la generación de glutatión se ve impedida, se observó una alta sensibilidad a las especies reactiva del oxígeno (EROS) en la mucosa intestinal resultando en la pérdida de integridad de la barrera intestinal e incremento de la inflamación ^[278]. Además, la eliminación específica en epitelio de una vía que controla la inducción de los mecanismos protectores contra estrés oxidativo dependientes de NRF2 resultó en un incremento en la generación de EROS y la apoptosis de las células de la cripta, inclusive células de Paneth ^[279, 280]. Este fenotipo es levemente menor en ratones mutantes para TAK1/TNFR1, donde la todavía existe apoptosis en la cripta intestinal sin que se vean afectadas las células de Paneth ^[280]. Estas similitudes con nuestros resultados abren la posibilidad de que el incremento de la apoptosis durante el RCA se deba a un aumento de la susceptibilidad de las células de la TAZ de la cripta a la apoptosis inducida por EROs. Se ha descrito al estrés oxidativo como un agente de daño durante el RCA en TxI ^[281]. A partir de lo expuesto, podemos hipotetizar que la apoptosis en el compartimiento epitelial durante los estadios tempranos de RCA es impulsada por las EROS producidas por la activación de linfocitos T aloreactivos en la lámina propia. Este tópico, así como también el daño sobre el endotelio, será objeto de los trabajos futuros del grupo de investigación.



CAPÍTULO II: Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en el Trasplante Intestinal

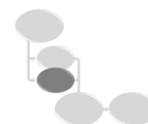
Introducción

I-Las células linfoides innatas

Las células linfoides innatas (CLIs) constituyen una familia de células recientemente descripta. Sin embargo, dos de sus miembros son conocidos desde hace muchísimo tiempo: las células NK y las células inductoras de tejido linfoide (LTi, del inglés *lymphoid tissue inducer*). Si bien ya se ha adelantado en la Introducción general, vale la pena recalcar que estas células tienen como características principales poseer morfología linfoide y carecer de receptores de antígenos rearrreglados como los linfocitos T y B. Tampoco expresan en su superficie marcadores específicos de células linfoides o mieloides, por lo que se consideran linaje negativas (Lin⁻) y se diferencian a partir del progenitor linfoide común (*Figura 2.1*). En los últimos años, se han identificado otras CLIs que, además de las características generales mencionadas, poseen patrones de secreción de citoquinas que imitan a los de los linfocitos T colaboradores (Th, del inglés *T helper*).

Spits y su equipo, propusieron una terminología común para esta familia de acuerdo a las características fenotípicas y funcionales usando como base la nomenclatura de los linfocitos Th^[35] (*Figura 2.1*).

En la introducción general, se citan algunas de las funciones conocidas de estas células correspondientes al sistema inmune de la mucosa intestinal. No obstante, las CLIs pueden interactuar con una amplia variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas para orquestar los fenómenos de inmunidad, inflamación y homeostasis en múltiples tejidos. Estas células poseen varias particularidades, incluyendo: 1) están presentes constitutivamente en órganos de barrera y órganos linfoides; 2) están transcripcionalmente y epigenéticamente activas; 3) tienen la capacidad de responder de forma rápida y robusta a las señales del entorno^[19]. Los LTh requieren varios días en los órganos linfoides donde se activan, se produce la expansión clonal, adquieren funciones efectoras y producen moléculas de superficie necesarias para la migración a tejidos no linfoides. En cambio, la mayoría de las CLIs son residentes de los tejidos no linfoides aún en estado estacionario y son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas cuando son estimuladas sin requerir un paso de diferenciación previo^[282]. Estas últimas, no requieren un antígeno específico ni coestimulación



y son activadas por una gran variedad de mediadores solubles tales como citoquinas, alarminas, lípidos y hormonas liberadas por células estromales, epiteliales o mieloides^[283].







	Grupo 1		Grupo 2	Grupo 3		
Factores de Transcripción	Eomes ↓ T-bet	T-bet ↓	GATA3 ↓	RORγt ↓	RORγt ↓	RORγt ↓
CLIs						
	NK	CLI1	CLI2	LTi	CLI3 NCR ⁻	CLI3 NCR ⁺
Citoquinas inductoras	IL-12 IL-15	IL-12 IL-15	IL-25 IL-33	IL-23 IL-1β	IL-23 IL-1β	IL-23 IL-1β
Citoquinas secretadas	IFNγ FNT	IFNγ FNT	IL-4/IL-5 IL-9/IL-13	IL-17A/F IL-22	IL-17A/F IL-22	IL-22
Función	Inmunidad contra virus y cáncer	Inmunidad contra bacterias intracelulares y protozoos	Inmunidad contra helmintos Homeostasis metabólica	Desarrollo de tejido linfoide Homeostasis intestinal Inmunidad contra bacterias extracelulares		
Patología	Inflamación crónica		Asma y alergias	Inflamación crónica		
Contraparte adaptativa	LTh1		LTh2	LTh22/17		

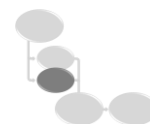
Figura 2.1: Células linfoides innatas (CLIs). Breve descripción de los factores necesarios para su desarrollo y activación, su fase efectora y las patologías asociadas a su desregulación. LTi, células inductoras de tejido linfoide (del inglés, lymphoid tissue inducer cells); LTh, linfocito CD4⁺.

Este capítulo se centrará en las células linfoides innatas del grupo 3, y particularmente en las CLI3s posnatales y en su función en la homeostasis intestinal.

II-Células linfoides innatas del grupo 3 posnatales

A nivel de los órganos de barrera, tales como la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal, se producen constantemente insultos por parte de los antígenos medioambientales y los microorganismos. Entonces, el mantenimiento de la salud de un individuo depende en gran medida de que se pueda montar una respuesta inmune adecuada ante cada uno de ellos. Por el contrario, una respuesta desregulada puede conducir a inflamación no sólo a nivel local sino también en órganos periféricos^[19].

Las CLI3s residentes, de gran abundancia en la lámina propia intestinal y en amígdalas^[42, 44], tienen la capacidad de integrar una compleja red de señales endógenas y exógenas para



conducir una respuesta adecuada y así mantener la homeostasis ^[284]. Estas señales se ven altamente modificadas durante los procesos de injuria e inflamación.

En la *Figura 2.2*, se esquematizan las distintas señales que las CLI3s deben interpretar (izquierda), una simplificación de las vías de transducción de señales involucradas (interior celular) y los principales mecanismos efectores (derecha).

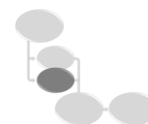
Las CLI3s, entonces, se valen de un mecanismo basado en la secreción de citoquinas y en el contacto célula-célula para el mantenimiento de la homeostasis intestinal ^[284].

La producción de IL-22, IL-17 y GM-CSF por parte de las CLI3s es secundaria a la inducción con IL-23 o IL-1 β ^[285, 286]. Estas últimas son provistas por los fagocitos mononucleares y las células dendríticas que son capaces de detectar cambios en la microbiota y en los antígenos de los alimentos ^[286, 287]. La IL-22 interactúa con células no hematopoyéticas, como las células epiteliales, induciendo la reparación del tejido y proliferación celular ^[288, 289]. Este concepto es de gran importancia en el presente trabajo y será abordado más adelante en este capítulo.

En ratones se ha demostrado que, mediante IL-22 e IL-17, las CLI3s intervienen en la defensa contra patógenos, tales como *Citrobacter rodentium* ^[290] ^[291], *Helicobacter sp* ^[292], *Clostridium difficile* ^[293, 294] y *Candida albicans* ^[294, 295], y en limitar las bacterias comensales ^[296]. Cabe recordar que la secreción de IL-22 o IL-17 es diferencial en las subpoblaciones de CLI3s en humanos ^[297]. La subpoblación CLI3s NKp44⁺ (o NCR⁺), libera grandes cantidades de IL-22 mientras que la producción de IL-17 es escasa. Las CLI3s NKp44⁻ (o NCR⁻), por el contrario, secretan IL-17 y una limitada cantidad de IL-22 (*Figura 2.1*).

Los M ϕ y las DCs inducen la producción GM-CSF por parte de las CLI3s. Se ha demostrado en modelos animales, que estas células son los mayores productores de dicho factor ^[286]. A su vez, GM-CSF regula la producción de citoquinas por parte de los fagocitos mononucleares que incide en la proliferación de LTregs. Por lo que, la interacción entre las CLI3s y los fagocitos mononucleares es responsable de la tolerancia a antígenos de la dieta y la flora.

Un mecanismo aprovechado por las CLI3s para alcanzar la homeostasis es limitar la respuesta adaptativa. Mediante el contacto célula-célula a través de las moléculas del CMH II, en ausencia de moléculas co-estimulatorias, inhiben la expansión y conducen a la apoptosis de los LTh específicos para bacterias comensales en ratones ^[298, 299]. La competencia por citoquinas necesarias para el mantenimiento y proliferación, tales como IL-2 e IL-7, parece también estar involucrada en este mecanismo. Si bien existen diferencias en la expresión de moléculas de superficie entre las CLI3s de ratón y humanas, se han detectado moléculas CMH II también en estas últimas ^[299]. Estas células también pueden actuar sobre las células



T y B mediante mediadores solubles. CLI3s NCR⁺ secretan IL-2 ^[300], el factor activador de células B (BAFF) que promueve la supervivencia y expansión de células B maduras y la quimiocina CCL20 que dirige la migración de los LT, LB y las CLI en el intestino ^[285].

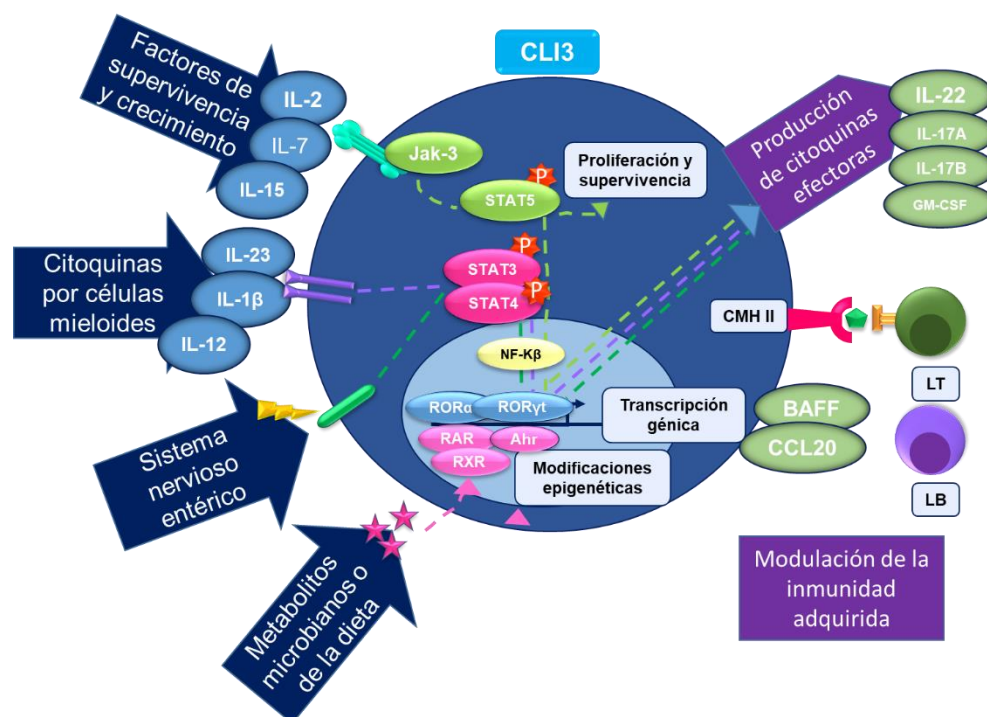
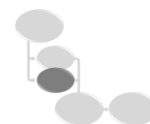


Figura 2.2: Las CLI3s como intérpretes de la inmunidad intestinal. A partir de diferentes señales del medioambiente (izquierda) las CLI3s modifican su perfiles de expresión génica, dando lugar a distintas respuestas (derecha) que incluyen la secreción de citoquinas y la modulación de la inmunidad adaptativa a través de mediadores solubles o el contacto célula-célula. IL-X, interleuquina X; P, residuo fosforilado; Jak-3; del inglés Janus kinase 3; STAT; del inglés signal transducer and activator of transription; NF- κ B, del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ROR, del inglés RAR-related orphan receptor gamma; RAR, receptor de ácido retinoico; RXR, receptor X retinoide; AhR, del inglés aryl hidrocarbon receptor; CMH II, molécula del complejo mayor di histocompatibilidad clase II; LT, linfocito T; LB, linfocito B; BAFF, factor activador de células B; CCL20, del inglés Chemokine (C-C motif) ligand 20. Modificado a partir de Withers et al. *Frontiers in immunology*, 8:1298 (2017).

Si bien no son el objeto de esta sección, las LT_i presentes en las placas de Peyer intervienen en la producción de IgA de forma célula T independiente ^[16, 301].

III- Rol de las células linfoides subgrupo 3 en patologías intestinales

Las CLI3s tienen un claro rol protector a nivel de la mucosa intestinal. No obstante, cambios dramáticos en el entorno provocan fallas en este delicado y equilibrado sistema contribuyendo al desarrollo de patologías. Estas pueden deberse a la alteración en la secreción de citoquinas por parte de las CLI3s o a la modificación de su representación. Si bien la mayor parte del conocimiento del rol de este tipo celular en patologías intestinales proviene de estudios con modelos animales, varios trabajos en humanos han sido recientemente publicados.



Pacientes que padecen enfermedad de Crohn, han evidenciado una disminución de la subpoblación de CLI3s productora de IL-22 [38, 302]. Además, a expensas de dicha subpoblación, se observó el aumento de una población inducible por IL-23 con fenotipo de célula NK [302] y de las CLI1s, ambas productoras de IFN γ [38]. Esta citoquina promueve la inflamación a nivel intestinal por debilitar las uniones estrechas de las células epiteliales, potenciar el reclutamiento de otros leucocitos y estimular fagocitos [303]. Geremia y colaboradores, a su vez, reportaron un incremento en CLI3s CD56⁻ secretoras de IL-17A e IFN γ [304]. Este trabajo pone en evidencia el rol pro-inflamatorio de la IL-17, lo cual es apoyado por varios estudios con ratones [292, 305]. Todas estas observaciones no fueron descritas en colitis ulcerosa, otra enfermedad inflamatoria intestinal [38, 304].

Las CLI3s se hallan disminuidas en sangre de pacientes que presentan EICH secundaria a trasplante de médula ósea [306] y, en modelos animales, la administración de IL-22 mejora los signos histológicos de la patología en intestino [276]. Sin embargo, una producción excesiva crónica de IL-22 contribuye con el desarrollo de cáncer de colon [307].

La infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o de simios (VIS), que eliminan completamente la CLI3s de la mucosa intestinal y de los nódulos linfáticos, provoca la disrupción de la barrera intestinal y el desarrollo de patología inflamatorias intestinales [308-310].

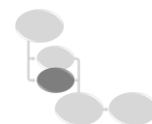
En pacientes con TxI, no hay estudios publicados hasta el momento que evalúen esta población en la mucosa intestinal. Talayero y colaboradores, detectaron un incremento de células linfoides CD3⁻ NKp44⁺ y de la producción de IL-22 en el compartimiento epitelial de biopsias de pacientes TxI en ausencia de signos de rechazo [64].

La desregulación de la respuesta por parte de las CLI3s intestinales, no sólo se limita a la secreción de citoquinas, sino que también se ha observado una disminución de la expresión de moléculas del CMH clase II y un sesgo a hacia una respuesta Th17 en pacientes con Enfermedad de Crohn [299, 311].

Futuras investigaciones tendientes a aumentar el conocimiento acerca del conjunto de señales que conllevan a la disminución de las CLI3s son necesarias para encontrar una forma de restaurarlas en número y función con el fin último de recuperar la homeostasis.

IV-Eje IL-22/ IL-22R

Como ya se ha mencionado previamente, el rechazo celular agudo posTxI tiene como blanco temprano a las células epiteliales [213]. Esta situación de injuria es de particular importancia en



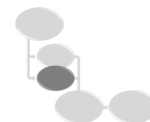
un órgano de barrera, dado que la pérdida de integridad de la misma permite la translocación bacteriana con el riesgo asociado de sepsis que esto conlleva. Pudiendo causar, en última instancia, la muerte del paciente.

La IL-22 ha resultado entonces de gran interés para nosotros por su impacto en la reparación de las barreras epiteliales luego de un evento de injuria. Esto se debe en gran medida a que promueve la supervivencia de las células al inducir la proliferación e inhibir los procesos que desencadenan la apoptosis ^[289, 312]. Esta citoquina monomérica, perteneciente a la familia de la IL-10, posee 146 aminoácidos (AA) (forma secretada) organizados en varias hélices α conectadas (*Figura 2.3A*) ^[313-315]. Su estructura está estabilizada por dos puentes disulfuro internos y posee al menos tres sitios de glicosilación ^[314, 315]. La IL-22, a diferencia de la mayoría de las citoquinas, no regula la función de células hematopoyéticas ^[289, 312]. Sus blancos principales son las células epiteliales y los fibroblastos de varios tejidos tales como pulmón, intestino, hígado, riñón, timo, páncreas, entre otros ^[289].

El receptor de IL-22, IL-22R, es un heterodímero formado por IL-22R1 e IL-10R2. Este último es común para toda la familia de la IL-10. Ambos tienen tres dominios: uno extracelular, un dominio transmembrana y otro dominio intracelular. La IL-22 tiene alta afinidad por el dominio extracelular de IL-22R1, por lo que se une al él primero y causa un cambio conformacional que permite la unión al dominio extracelular de IL-10R2. La porción intracelular de IL-22R1 es más larga que la de IL-10R2 y posee los sitios de unión para las moléculas STAT. La vía de señalización más importante para IL-22 es la vía de las quinasas Janus (Jak)-STAT3 (*Figura 2.3B*) ^[316]. Una vez que se ha formado el complejo IL-22/IL-22RA1/IL-10R2, se produce la fosforilación de las Jak que están asociadas al dominio intracelular de IL-22RA1. Éstas, a su vez, fosforilan un residuo específico en ese mismo dominio donde se va a unir la molécula STAT3 ^[317]. Luego, también activan por fosforilación a STAT3 que posteriormente dimeriza y se transloca al núcleo para officiar de factor de transcripción de los genes blanco ^[318]. Si bien esta es la vía principal, también se ha reportado la activación de las vías de las quinasas MAP ^[316], AKT y mTOR ^[319].

Dado que el IL-10R2 está expresado ubicuamente en el cuerpo, la especificidad de IL-22 está dada por la expresión del IL-22RA1 ^[320]. Como se ha mencionado anteriormente, este receptor se expresa en las células madre intestinales. En la mucosa intestinal, también podemos encontrar las mayores fuentes de IL-22 que son los LTh22, las células NKT y, el tipo celular abordado con profundidad en este capítulo, las CLI3s.

El eje IL-22/IL-22R fue extensamente estudiado en intestino demostrando que tiene un gran impacto en la regeneración del epitelio intestinal. En experimentos de cultivos de organoides,



tanto humanos como murinos, se mostró que el agregado de IL-22 fue fundamental para la expansión y proliferación de células madre intestinales que expresan el IL-22R. Como consecuencia de ello, las criptas en dichos organoides fueron desarrollándose e incrementando su tamaño [321].

En un estudio con ratones, la administración externa de IL-22 mostró un rol protector sobre las ISC [260] que son altamente dañadas durante el curso de EICH secundaria al trasplante de médula ósea [260-262]. La importancia del eje IL-22/IL-22R también ha sido demostrada en la clínica con pacientes con evidencia de EICH [306].

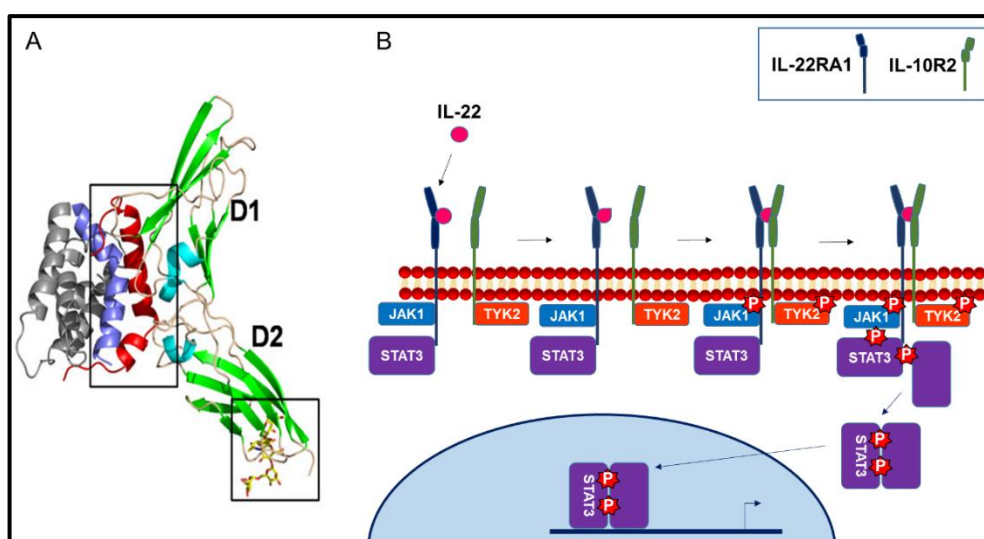


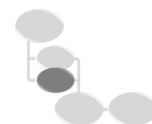
Figura 2.3: Interacción IL-22/IL22R. A) Esquema 3D de la IL-22 interactuando con los dominios 1 y 2 (D1, D2) del IL-22RA1 (Jones, B. et al. *Structure*, 10; 16(9): 1333–1344 (2018)). B) Vía de señalización JAK-STAT a partir de IL-22.

En este capítulo, nos propusimos evaluar el estado del eje IL-22/IL-22R y los principales productores de IL-22 en la mucosa intestinal en el TxI y durante los eventos de RCA asociados. Haciendo especial hincapié en esta población recientemente descrita, las CLI3s, que ha demostrado tener gran impacto a pesar de estar menos representadas que su contraparte adaptativa (LTh).

Materiales y Métodos

I-Pacientes

En este estudio, se incluyeron a los pacientes con trasplante intestinal que se hallaban en seguimiento postrasplante desde Abril del año 2014 a Agosto de 2017. El mismo, forma parte del protocolo aprobado por el Comité de Ética mencionado en el Capítulo 1 (DDI (1125) 511).



Para Abril de 2014, en el programa de trasplante intestinal del ITMO se habían practicado 40 trasplantes en 38 pacientes. De ellos, 18 habían fallecido. Entre los 20 restantes, 15 poseían 2 años o más de seguimiento y los otros 5 cursaban el año o año y medio postrasplante. Como se ha explicado anteriormente, habiendo transcurrido un año del trasplante, las biopsias de control se hacen menos frecuentes y sólo se retoma el protocolo en caso de aparición de síntomas clínicos. Mientras este estudio se desarrollaba, se llevaron a cabo 6 TxI más, de los cuáles uno es un re-TxI debido a la pérdida inmediata del injerto por rechazo hiperagudo. De estos 5 pacientes, uno falleció al mes postTxI por sepsis y otro perdió el injerto a los seis meses por rechazo crónico.

Para este protocolo de investigación, se destinaron 3 biopsias de íleon distal por paciente obtenidas durante el procedimiento endoscópico de control (*Figura 2.4*). Las mismas se toman de forma paralela a las biopsias para el análisis histopatológico, para que sean representativas del mismo proceso observado en el diagnóstico. Para alcanzar los objetivos propuestos en este capítulo, las biopsias fueron procesadas en fresco. Por lo que, las técnicas que serán explicadas a continuación, son aplicadas sobre las muestras en desconocimiento del diagnóstico definitivo de estado del injerto. Una vez que la evaluación histopatológica fue realizada, se obtuvo el diagnóstico y en base al mismo se clasificaron los resultados en grupos:

- **Normal (TxIN):** Ausencia de signos histológicos de RCA.
- **Rechazo Leve (TxIRL):** Evidencia de cambios histológicos asociados al RCA leve.

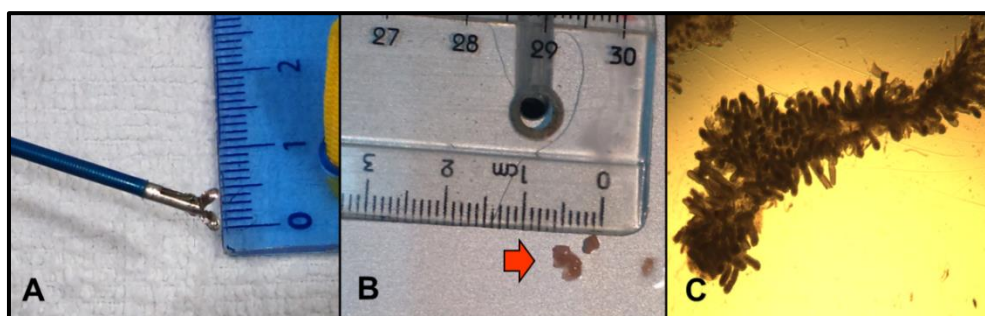
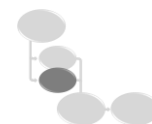


Figura 2.4: Biopsias intestinales para el seguimiento postTxI. A) Pinza para toma de biopsias endoscópicas. B) Biopsias intestinales de un paciente TxI (flecha roja). C) Biopsia intestinal vista a través de lupa binocular donde se observa intacta la arquitectura de la mucosa.

Se incluyó también un grupo **Control (C)**, como se ha explicado en el Capítulo 1, conformado por pacientes voluntarios sanos que acuden a nuestro centro con el fin de realizarse el monitoreo endoscópico para detección temprana y prevención de cáncer de colon (DDI (1251) 1914). Estas muestras están libres de complicaciones y del uso de drogas inmunosupresoras,



lo que nos permite evaluar los efectos de la inmunosupresión sobre las poblaciones celulares en el intestino.

A modo complementario, se aprovecharán las muestras utilizadas para análisis de expresión de genes obtenidas para el estudio discutido en el Capítulo 1.

Las CLIs constituyen una población poco representada en comparación con otras células inmunes. Por lo que, para estudiarlas, se propuso a las amígdalas como fuente alternativa. Las mismas fueron obtenidas de amigdalectomías realizadas por prevención en pacientes pediátricos.

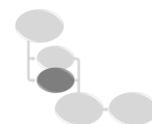
II-Aislamiento de linfocitos de lámina propia de biopsias intestinales

Las biopsias intestinales se colectaron en solución tamponada de Hanks (HBSS) fría y se procesaron inmediatamente después de su obtención. La información de los pacientes incluidos en este estudio se detalla en la *Tabla 2.1*.

Se eliminó la capa epitelial mediante la incubación en EDTA 5% durante 20 min a TA con agitación constante. Se retiraron los FLAs y las PPs y, luego de varios lavados, la lámina propia se sometió a digestión enzimática con colagenasa 1a 62 U/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 1h a 37°C, también con agitación constante. Una vez finalizada la digestión, se recuperaron las células aisladas por centrifugación y se lisaron los glóbulos rojos con solución de lisis amonio-cloruro-potasio (ACK) por 3 min a TA. Se lavaron y reservaron las células 4°C.

Grupo	Patología	Edad	Tipo de TxI	Colon	Inmunosupresión	Días Post-Tx	Eventos de rechazo	Virología
No-Tx	Control (n=7)	56.7 ± 7.6						
TxI	TxIN (n=17)	11.8 ± 9.1	• Aislado • TxMVM	• Nativo • Tx	• Tac/corticoides • Tac/MMF • Tac/Sir • Tac/Sir/corticoides	1310 ± 908	4.6 ± 2.9	• VEB • Calicivirus
	TxIRL (n=4)	10.0 ± 6.0	• Aislado	• Nativo	• Tac/MMF • Tac/Sir/corticoides	1803 ± 1595	3.5 ± 2.4	• Negativo

Tabla 2.1: Descripción de los pacientes incluidos en el estudio. Tx, trasplante; TxIN, trasplantado sin rechazo; TxIRL, trasplantado con rechazo leve; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato; Sir, sirolimus; TxMVM, trasplante multivisceral modificado; VEB, virus Epstein-Barr.



III-Enriquecimiento de las muestras en CLIs

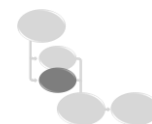
Dado que la población de interés es minoritaria, se realizó un paso de enriquecimiento mediante un sistema de separación magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Alemania) con esferas anti-CD4. Las células obtenidas a partir de la lámina propia de las biopsias se incubaron con estas esferas durante 20 min a 4°C en solución fosfato salina (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) suplementado con albúmina sérica bovina 0,5% y EDTA 2mM. Luego, se realizó el pasaje de la suspensión por una columna que está en contacto con un potente imán. Las células CD4⁺ unidas a las esferas quedan retenidas, mientras que el resto de las células forma parte del eluato. Este se lavó y reservó para análisis por citometría de flujo. La población CD4⁺, se recuperó lavando la columna una vez retirada del imán y se guardó para ensayos de expresión génica.

IV-Análisis de células innatas mediante citometría de flujo

Los linfocitos CD4⁺ aislados de lámina propia se incubaron durante 15 min a 4°C y en oscuridad con los siguientes anticuerpos: anti-CD3, anti-CD19, anti-CD127, anti-CD294, anti-CD117, anti-NKp44, anti-CD56 y anti-HLA DR (ver detalles en *Tabla 2.2*). Distintas combinaciones de estos anticuerpos nos permitieron determinar las frecuencias de las células NK, las CLIs de los 3 subgrupos conocidos. En la *Tabla 2.3* se especifica la expresión diferencial de dichas moléculas en la superficie de las células de interés. La lectura realizó mediante el citómetro FACS Canto II (Becton, Dickinson & Co., NJ, USA) y los resultados se analizaron mediante el programa FlowJo 7.6.2.

Anticuerpo	Fluorocromo	Proveedor	Clon	Especificidad
Anti-CD3	APC-H7	BD	SK7	Humano
Anti-CD19	APC-H7	Biolegend	H1B19	Humano
Anti-CD127	Pe	BD	HIL-7R-M21	Humano
Anti-CD294	PERCPy5.5	Biolegend	BM16	Humano
Anti-CD117	PeCy7	BD	104D2	Humano
Anti-NKp44	Alexa 647	BD	P44-8	Humano
Anti-CD56	FITC	BD	B159	Humano
Anti-HLA DR	PE	eBioscience	LN3	Humano

Tabla 2.2: Especificaciones de los anticuerpos utilizados en citometría de flujo.



Molécula	Descripción	NKs	CLI1s	CLI2s	CLI3s
CD3	Co-receptor LT	-	-	-	-
CD19	Co-receptor LB	-	-	-	-
CD127	Receptor IL-7	-	+	+	+
CD294	Receptor de prostaglandina D2	-	-	+	-
CD117	c-Kit	-	-	+/-	+
NKp44	KAR	+/-	-	-	+/-
CD56	NCAM	+	-	-	+/-

Tabla 2.3: Identificación de las células linfoides innatas mediante sus moléculas de superficie. LT, linfocito T; LB, linfocito B; KAR, del inglés killer activation receptor; NCAM, del inglés neural cell adhesion molecule.

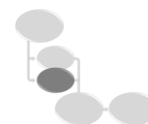
La expresión de las moléculas del CMH clase II, fue utilizada para revelar características funcionales de dichas poblaciones.

V-Purificación de CLI3s a partir de amígdalas

Si bien ha sido publicado que los cambios de perfil secretor en las CLI3s dependen de la expresión de NKp44, hay trabajos anteriores que los relacionaban con la expresión de CD56. Entonces, se decidió realizar una prueba piloto con amígdalas (n=3) provenientes de pacientes pediátricos con el propósito de definir si existe una relación entre dichas moléculas.

Para obtener la población leucocitaria a partir de las amígdalas, se procedió a la disrupción mecánica de la misma en PBS frío. Luego de separar las porciones no friables, se centrifugó a 500 rpm 1 min para aislar las células del tejido no disgregado. Posteriormente, la suspensión se sometió a una separación por gradiente con Ficoll-Paque PLUS (densidad: 1.077 g/mL; GE Healthcare, Miami, USA). La misma se centrifugó durante 20 min a 1700 rpm en presencia de Ficoll. Una vez formado el gradiente, se retiró cuidadosamente la interfase enriquecida en leucocitos y se lavó repetidamente con PBS.

Las amígdalas están altamente pobladas por LB, constituyendo esta población aproximadamente un 70% de su composición celular. Como se ha mencionado anteriormente, las CLIs constituyen una familia de células con bajo número en los tejidos y para enriquecer la muestra en ellas se procedió a realizar un paso de separación magnética similar al explicado en el apartado III de esta sección. En este caso, se utilizó una combinación de esferas anti-CD19 y anti-CD3 (Miltenyi Biotec, Alemania) para incubar la muestra durante 20 min a 4°C.



Luego del pasaje a través de la columna, recuperamos el eluato que posee disminuida la cantidad de LT y LB respecto a la original.

Sobre esta suspensión celular se purificaron las CLI3s en condiciones no estériles utilizando el citómetro de flujo FACS Aria II (Becton, Dickinson & Co., NJ, USA). Para ello, las células del eluato se incubaron con los anticuerpos indicados anteriormente durante 15 min a TA. Una vez en el citómetro, se siguió el esquema representado en la *Figura 2.5* para identificar las distintas subpoblaciones de CLI3s a separar (CLI3s NCR⁺ CD56^{+/−} y CLI3s NCR[−] CD56^{+/−}). Las células se aislaron en tubos con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%, fueron lavadas y reservadas a -4°C.

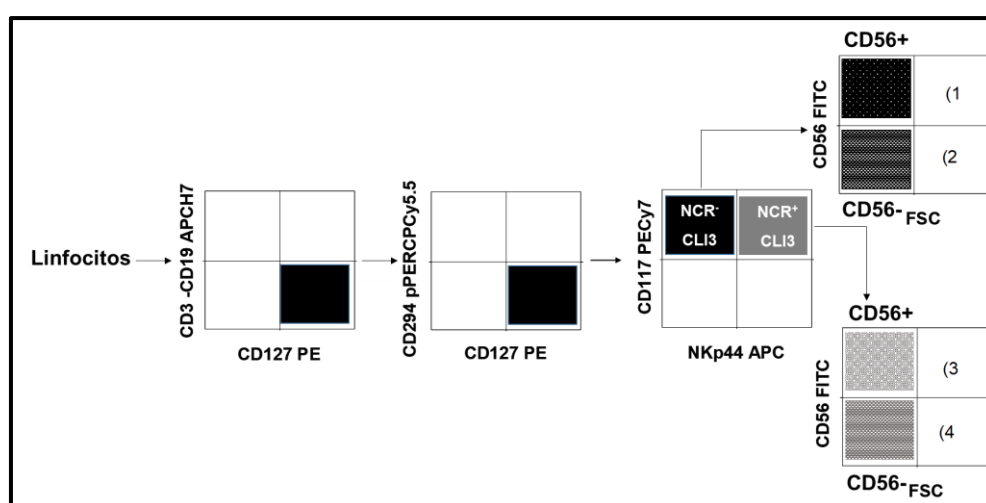
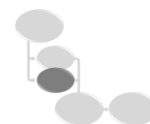


Figura 2.5: Esquema de purificación de CLI3s. Las subpoblaciones separadas son 1) CLI3s NCR[−] CD56⁺, 2) CLI3s NCR[−] CD56[−], 3) CLI3s NCR⁺ CD56⁺, 4) CLI3s NCR⁺ CD56[−].

VI-Ensayo de inducción en CLI3s purificadas

Las distintas subpoblaciones de CLI3s purificadas mediante citometría de flujo, fueron cultivadas in vitro en placas de 48 pocillos a 37°C en medio RPMI (Life Technologies, CA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, MO, USA) y solución antibiótica- antimicótica Gibco (Life Technologies, CA, USA) durante 2 hs. La cantidad de células obtenidas para cada subpoblación fue dividida a la mitad. En una de ellas fueron adicionados, además, PMA 25ng/ml (del inglés, *phorbol-12-myristate-13-acetate*. Sigma, MO, USA) e ionomicina 1µg/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) para estimular la expresión génica.

Luego de 2h, las células se lavaron y resuspendieron en solución de lisis de ARN (Promega, WI, USA) y posteriormente fueron almacenadas a -70°C hasta el momento del procesamiento.



VII-Análisis de la expresión génica

En este capítulo se mostrarán resultados de expresión génica proveniente de diferentes muestras. Por lo que, se explicarán las particularidades de cada ensayo por separado a continuación.

- IL-22 en biopsias intestinales:

Para la determinación de la *IL22* en biopsias intestinales se utilizaron las mismas muestras que en el capítulo 1 (*Tabla 1.2*). Los detalles de la extracción del ARN, la transcripción reversa y la qPCR se hallan descriptos en la sección de materiales y métodos de dicho capítulo. Las características del gen y los cebadores utilizados para la determinación se encuentran en la *Tabla 2.4*.

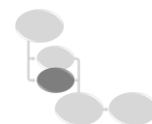
- Perfiles de los LT CD4⁺:

Los linfocitos T CD4⁺ provienen de la separación magnética mediante esferas anti-CD4 de los leucocitos aislados de la lámina propia. Estos fueron recolectados en su totalidad en solución de lisis de RNA (Promega, WI, USA) y almacenados a -70°C. La extracción se realizó mediante el kit RNASpin Mini (GE Healthcare, Miami, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso, dado que el número de células obtenido es muy bajo (10.000-40.000 células por paciente), se adaptaron los volúmenes de recolección recomendados para recuperar la mayor cantidad de ARN en menor volumen posible. De esta manera, el material de partida para la transcripción reversa es más concentrado, consistiendo en el 50% aproximadamente de lo recuperado. Esta reacción, fue llevada a cabo utilizando transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, CA, USA) y cebadores aleatorios (Invitrogen, CA, USA).

Con estas modificaciones de protocolo se logró que el sistema de extracción estándar funcionara como si fuera uno para bajo número de copias.

Finalmente, la PCR cuantitativa se llevó a cabo con SYBR Green PCR Mix (Life Technologies) en un ciclador térmico iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se utilizó como referencia el gen beta-actina y el incremento en la expresión respecto al promedio de la expresión del grupo control (normalizador) se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (o $2^{-\Delta\Delta C_t}$) tal como se ha explicado en el capítulo 1.

Los genes asociados los distintos perfiles Th, tanto factores de transcripción necesarios para la diferenciación como citoquinas, fueron cuantificados (*Tabla 2.4*): Th1 (*TBET* e *IFN γ*); Th2 (*GATA3* e *IL13*); Th22/17 (*RORC*, *IL22* e *IL17*).



• Análisis del perfil secretor de las CLI3s provenientes de amígdalas:

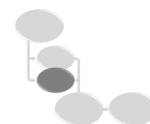
Las cuatro subpoblaciones sorteadas (1- CLI3s NCR⁻ CD56⁺, 2- CLI3s NCR⁻ CD56⁻, 3- CLI3s NCR⁺ CD56⁺, 4- CLI3s NCR⁺ CD56⁻), luego de la inducción, se recolectaron en solución de lisis de RNA. Sobre este material, se aplicó la técnica de extracción con las modificaciones antes mencionadas para el trabajo con bajo número de células. La PCR en tiempo real se ajustó a las indicaciones ya explicadas. No obstante, para este ensayo no existe una población control. La función de normalizador la cumple la fracción de células de cada subpoblación no sometida a inducción. El incremento de la expresión se calcula, entonces, con respecto al nivel promedio de expresión de cada gen en la fracción no inducida. Los genes evaluados en este caso son: *IL22*, *IL17A* y *GMSCF* (Tabla 2.4).

GeneID	Símbolo	Descripción	Tipo Celular	Secuencia 5'→3'
NM_020525.4	<i>IL22</i>	Interleuquina 22	LTh22- CLI3	CAACAGGCTAAGCACATGTCA ACTGTGTCTTCAGCTTTTGC
NM_002190.2	<i>IL17</i>	Interleuquina 17	LTh17-CLI3	CCTCAGATTACTACAACCGA GACACCAGTATCTTCTCCAG
NM_000758.3	<i>CSF2</i> o <i>GMSCF</i>	Factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos	CLI3	AAATGTTTGACCTCCAGGAGCC ATCTGGGTTGCAAGGAAGTT
NM_001001523.1	<i>RORC</i>	Receptor gamma relacionado al receptor de ácido retinoico	LTh17/22- CLI3	TGGAGCTGGCCTTTCATCA GCTACACAGGCTCCGAAGCTT
NM_001354991.1	<i>IL13</i>	Interleuquina 13	LTh2- CLI2	ACAGTTCAACTGAACTTCG TCTGCAACTTCAATAGCTAG
NM_001002295.1	<i>GATA3</i>	Proteína 3 de unión a GATA	LTh2- CLI2	ACTACGGAACTCGGTTCAGG GGTAGGGATCCATGAAGCAG
NM_000619.2	<i>IFNG</i>	Interferón γ	LTh1- CLI1-NK	CCAACGCAAAGCATACATGA TTTTTCGCTTCCCTTTGC
NM_013351.1	<i>TBET</i> o <i>TBX21</i>	T-box 21	LTh1- CLI1-NK	CCGTGACTGCCTACCAGAAT ATCTCCCCCAAGGAATTGAC
NM_000660.6	<i>TGFB</i>	Factor de crecimiento β1	Tregs	GAGCTGTACCAGAAATACAG GTGACATCAAAAGATAACCA
NM_001114377.1	<i>FOXP3</i>	Forkhead box 3 (del inglés)	Tregs	CATGATCAGCCTCACACCAC CCACTTGACAGACACCATTTG

Tabla 2.4: Genes y cebadores utilizados en los análisis de expresión génica.

VIII-Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante los test de Kruskal-Wallis con post test de Dunn y el U de Mann-Whitney cuando más de dos grupos o sólo dos fueron analizados, respectivamente. En el caso del análisis de expresión de las ubpoblaciones de CLI3s en amígdala se usó ANOVA para muestras apareadas con post-test de Tukey. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 5.01 (San Diego, USA).



Resultados

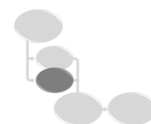
I-Las células linfoides innatas no se ven afectadas por el esquema de inmunosupresión

En los últimos años, se le han atribuido a las células linfoides innatas del subgrupo 3 (CLI3s) roles decisivos en la fisiología de los mamíferos incluyendo reparación tisular, generación de tejido linfóide y modulación del sistema inmune [322]. No obstante, no existen demasiados reportes que evalúen el comportamiento de las mismas en un contexto de inmunosupresión. Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes con TxI reciben diariamente altas dosis de drogas inmunosupresoras con el objeto de evitar eventos de RCA los cuáles ponen en riesgo la supervivencia del órgano y del mismo paciente. Dado que las células T constituyen el blanco principal de las drogas inmunosupresoras y la similitud que existe entre ellas y las CLIs, no sería inverosímil que estas últimas también se vieran afectadas. Para evaluar si el esquema inmunosupresor tiene algún tipo de efecto sobre esta población celular, se identificaron y cuantificaron mediante citometría de flujo las NKs, las CLIs y las CLI3s aisladas a partir de lámina propia de biopsias de pacientes trasplantados, normales y con evidencia de rechazo leve, y de pacientes sanos (condición control).

La *Figura 2.6* muestra el comportamiento de las clásicas células NK en el TxI. Estas fueron definidas a partir de los linfocitos como $CD3^- CD19^- CD127^- CD117^- CD56^+$ y la expresión de NKp44 depende de su estado de activación (*Figura 2.6A*).

La frecuencia de las células linfoides innatas clásicas, las células NK, no se vio modificada por el esquema de inmunosupresión dado que los porcentajes de los grupos TxIN (n=17) y TxIRL (n=4) fueron similares al obtenido en el grupo Control (n=7): $2,2 \pm 0,5$; $2,0 \pm 0,6$; $2,7 \pm 0,9$, respectivamente (*Figura 2.6B*). Al evaluar el estado de activación de las mismas en la *Figura 2.6C*, se observó un aumento significativo del porcentaje de NK que expresan NKp44 entre el grupo con rechazo leve ($11,0 \pm 0,8$) respecto al no trasplantado ($4,4 \pm 1,0$; $p=0,017$). Este hallazgo no resulta sorprendente en un contexto inflamatorio como el que ofrece el TxI y, más aún, el RCA.

Las CLIs totales y las distintas subpoblaciones fueron determinadas por citometría de flujo tal y como se muestra en la *Figura 2.7A* en las mismas biopsias frescas de pacientes mencionados anteriormente. El porcentaje de CLIs ($CD3^-$, $CD19^-$, $CD127^+$) sobre el total de linfocitos sufrió un leve detrimento en los grupos trasplantados respecto al control, no obstante éste no fue significativo. El valor medio para los grupos Control, TxIN y TxIRI fue $4,2 \pm 0,4$, $2,4 \pm 0,6$ y $2,2 \pm 0,9$, respectivamente (*Figura 2.7B*).



Como ya se ha descrito, las tres subpoblaciones que componen las CLIs de diferente perfil que se asemeja al evidenciado por los distintos LTh. Se analizó, entonces, la abundancia de cada una de ellas sobre el total de CLIs en la muestra (*Figura 2.7C*). Las CLI1 (CLI CD294⁻ CD117⁻) fueron las más representadas y no se observaron diferencias significativas entre grupos. Del mismo modo, aunque menos abundantes, las CLI2 (CLI CD294⁺) y las CLI3 (CLI CD294⁻ CD117⁺) no se modificaron de forma relevante ante el tratamiento. Estos resultados implican que no hay un impacto considerable de la inmunosupresión en las células linfoides innatas analizadas, al menos en la serie de pacientes incluidos.

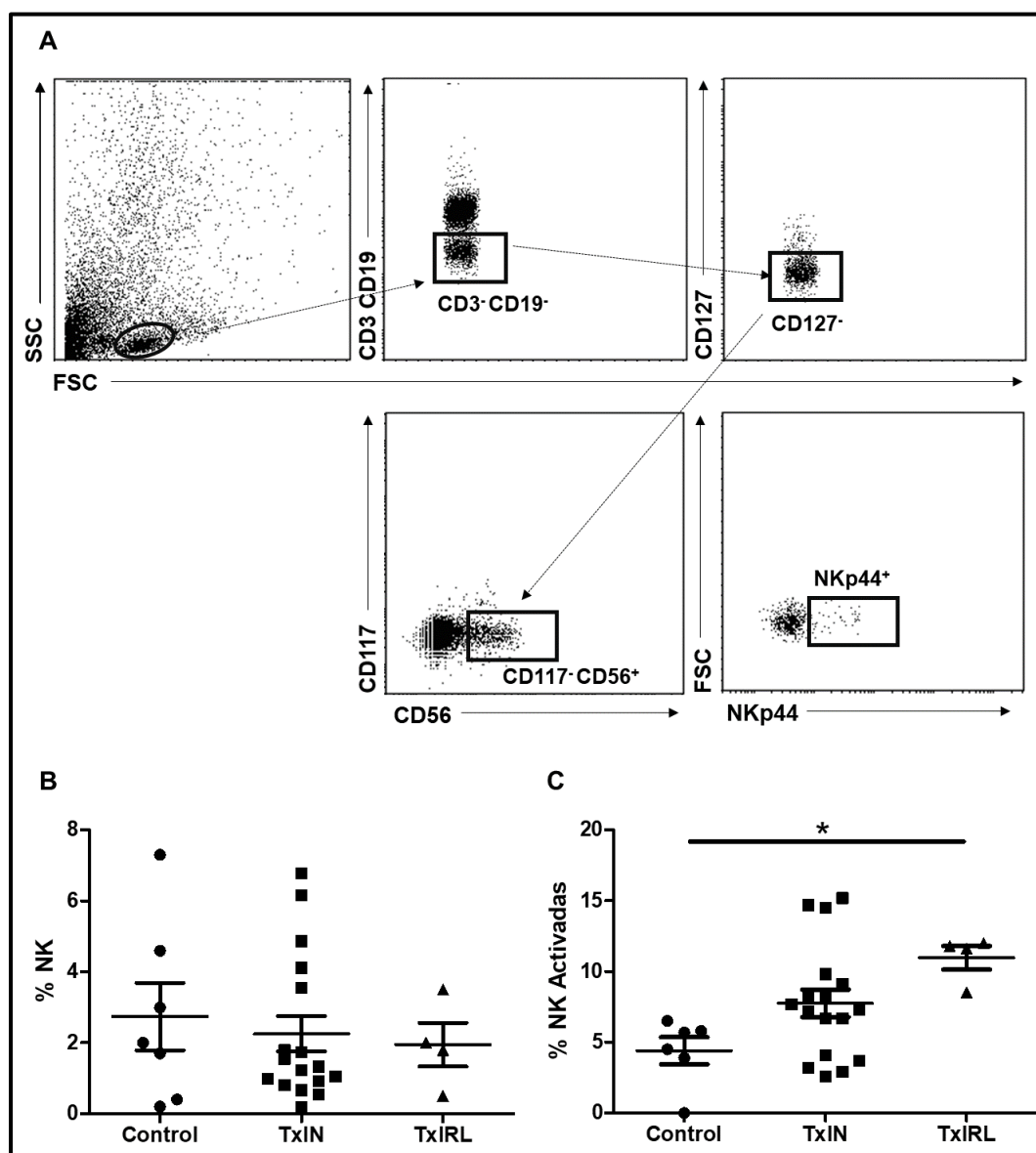


Figura 2.6: Células NK en el TxI. Análisis por citometría de flujo de células linfoides aisladas de biopsias frescas de pacientes no trasplantados (Control; n=7), trasplantados sin rechazo (TxIN, n=17) y con evidencia de rechazo leve (TxIRL, n=4). A) Esquema de identificación. B) Frecuencia de la población NK el total de linfocitos en la muestra C) Activación de las NKs. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. *P < 0.05.

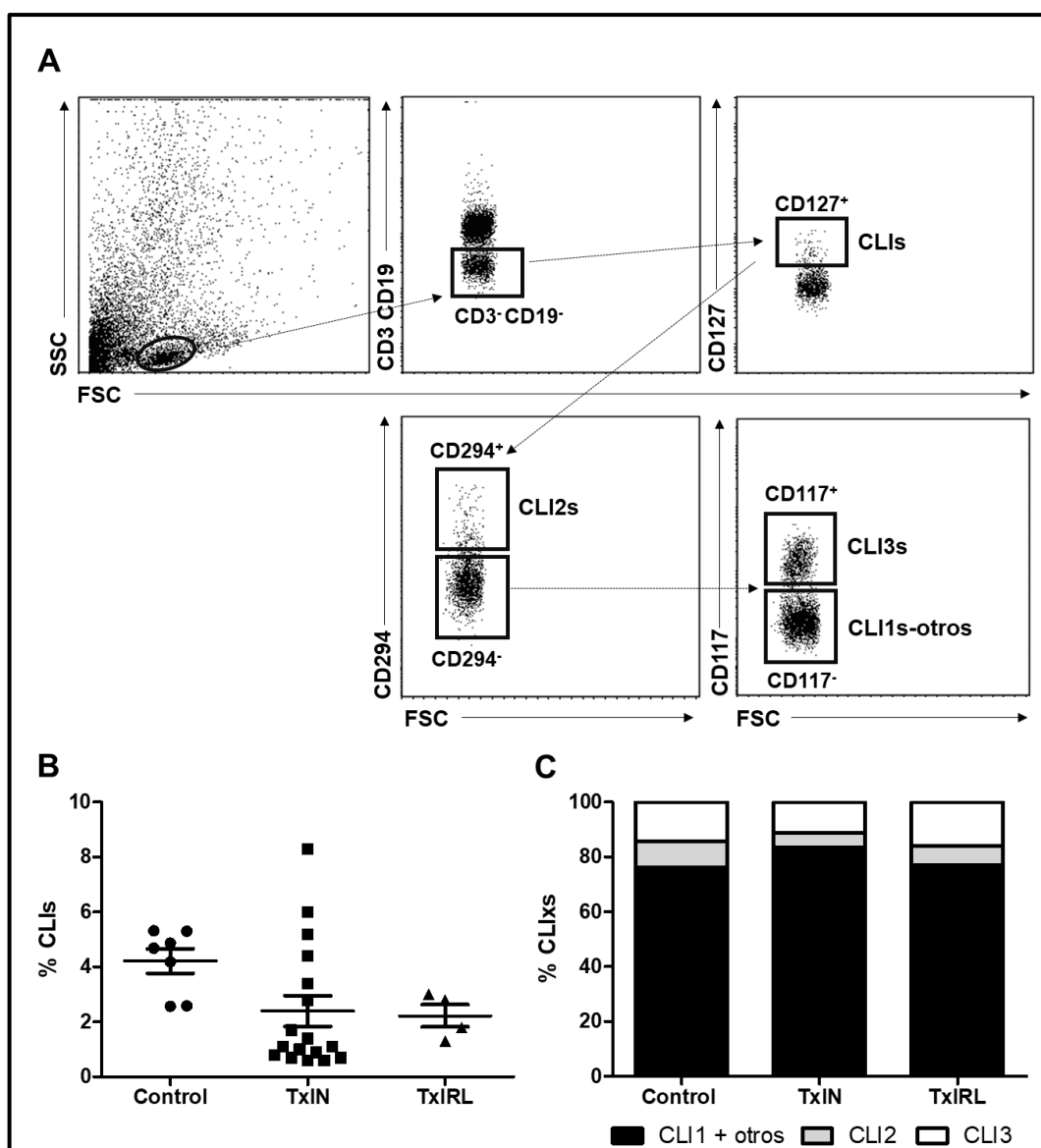
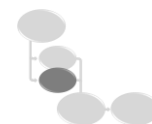
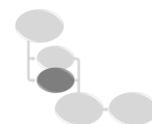


Figura 2.7: Efecto del esquema de inmunosupresión sobre las células linfoides innatas. Análisis por citometría de flujo de células linfoides aisladas de biopsias frescas de pacientes no trasplantados (Control; n=7) y pacientes trasplantados con histología normal (TxIN; n=17) o con evidencias histológicas de rechazo leve (TxIRL; n=4). (A) Esquema de identificación. (B) Proporción de células linfoides innatas (CLIs) sobre el total de linfocitos presentes en lámina propia. (C) Porcentaje de las distintas subpoblaciones de CLIs (CLI1, CLI2, CLI3) sobre el total de CLIs. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn.

II-La frecuencia de CLI3s NCR⁺ y el nivel del interleuquina 22 disminuyen durante los eventos de rechazo celular agudo

Se ha descrito una subpoblación de células linfoides innatas de subgrupo 3 (CLI3s) que expresan el marcador de superficie Nkp44 clásicamente atribuido a células NK. Esta subpoblación de CLI3s, denominada NCR⁺, participan en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial gastrointestinal en varios modelos experimentales de injuria intestinal,



siendo potentes productoras de IL-22 ^[322]. Ésta citoquina constituye una vía importante por la cual las células inmunes controlan la función de las células madre intestinales (ISC) que expresan IL-22R, induciendo mecanismos de reparación tisular y disminución de los efectos de patologías intestinales ^[321, 323].

Por otro lado, la ausencia de NKp44 define a la subpoblación CLI3 NCR⁻. Esta última secreta la citoquina IL-17 con efectos pro-inflamatorios ^[322]. Con el objeto de esclarecer cuál es el comportamiento de estas poblaciones antagónicas durante eventos de rechazo celular agudo posTxI, se analizó el nivel de expresión del marcador NKp44 sobre la población de CLI3s ya identificada en biopsias de pacientes TxI con y sin evidencia de rechazo en comparación con aquellas obtenidas de pacientes control.

Las poblaciones NCR⁻ y NCR⁺ de CLI3s se identificaron como muestra el esquema representativo de la *Figura 2.8A*. Ya se ha mencionado que las CLI3 no se ven afectadas por el esquema de inmunosupresión, lo que se vuelve a vislumbrar en la *Figura 2.8B* donde se exponen los porcentajes individuales de cada muestra en cada grupo. Las CLI3s constituyen el $14,2 \pm 3,5$ % de las CLIs totales en el grupo control, el $20,1 \pm 2,6$ % en TxIN y el $16,0 \pm 6,9$ % en el grupo con rechazo leve. En cuanto al análisis de la expresión del marcador NKp44, la frecuencia de CLI3 NCR⁺ los grupos control y TxIN se mantuvo sin cambios ($65,2 \pm 3,7$ y $71,9 \pm 2,6$; respectivamente). Sin embargo, en el grupo TxIRL las CLI3s NCR⁺ representan el $27,2 \pm 14,3$ % de las CLIs totales y este valor evidenció una disminución significativa en respecto al TxI sin rechazo ($p=0.0088$; *Figura 2.8C*). De forma inversa, el porcentaje de CLI3s que no expresan NKp44 se encuentra aumentado en TxIRL ($p=0.0054$; *Figura 2.8D*).

A su vez, también se evaluó los niveles de la interleuquina 22 en biopsias intestinales para corroborar si la disminución en la población CLI3s NCR⁺ tiene algún efecto sobre dicha citoquina. En la *Figura 2.9* se muestran los resultados del análisis de la expresión del gen *IL22* en pacientes TxI con histología normal (TxIN; n=5) y con rechazo, en este caso moderado (TxIRM; n=6), usando como normalizador la población no trasplantada. El incremento promedio respecto al control en TxIN fue de $72,5 \pm 58,7$ mientras que en TxIRM apenas alcanzó las $5,7 \pm 3,4$ veces. Si bien no se evidenciaron diferencias significativas, la expresión de dicha citoquina se vio marcadamente afectada durante el RCA ($p=0,0628$).

Estos resultados indican que la disminución de la proporción de CLI3s NCR⁺ podría ser responsable, en parte, de la reducción de *IL22* en la lámina propia en el contexto del rechazo celular.

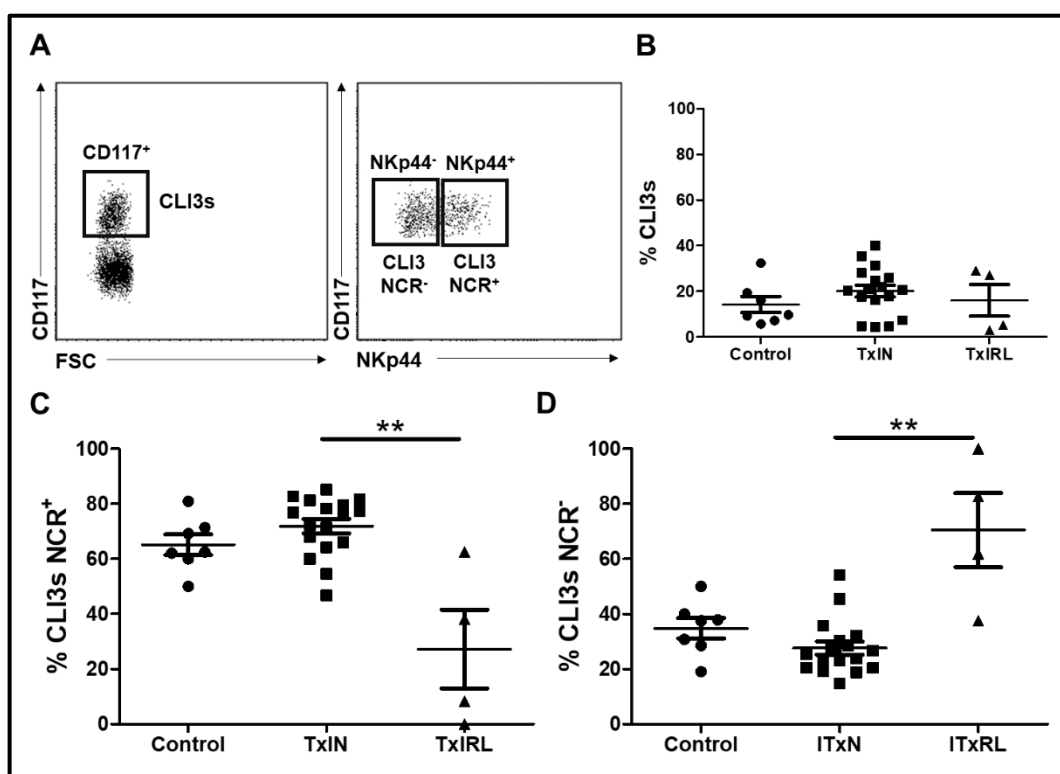
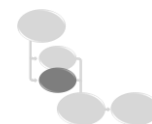


Figura 2.8: Disminución de la población CLI3s NCR⁺ durante el rechazo celular agudo. Análisis por citometría de flujo de células linfoides aisladas de biopsias frescas de pacientes no trasplantados (Control; n=7) y pacientes trasplantados con histología normal (TxIN; n=17) o con evidencias histológicas de rechazo leve (TxIRL; n=4). (A) Esquema de identificación. (B) Porcentaje de células linfoides innatas subgrupo 3 (CLI3) sobre el total de CLIs (C) Porcentaje de CLI3s que expresan NKp44 (NCR⁺). (D) Porcentaje de CLI3s que no expresan NKp44 (NCR⁻). Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. **P < 0.01.

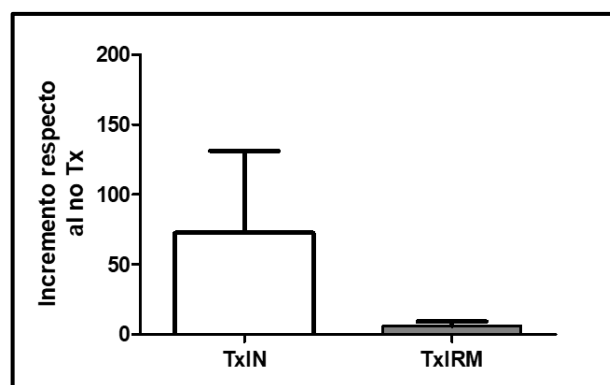
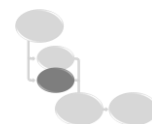


Figura 2.9: Expresión de IL22 en RCA. Mediante qPCR se evaluó el nivel de expresión génica de IL22 en los grupos TxIN (n=5) y TxIRM (n=6). La expresión del gen fue normalizada usando β -actina. El incremento fue calculado a través del método $\Delta\Delta C_t$, usando el promedio de los controles no Tx como referencia. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney a una cola.

III-Perfil de los linfocitos T CD4⁺ en el rechazo celular agudo

Además de las CLIs, los otros grandes productores de citoquinas son los linfocitos Th. Particularmente, los LTh22 producen grandes cantidades de IL-22 y constituyen la contraparte



adaptativa de las CLI3s. Para realizar un relevamiento del estado de esta población celular tan representada en la lámina propia durante el RCA posTxI, se evaluó la expresión de los genes correspondientes a los factores de transcripción y a las citoquinas asociadas a cada perfil Th sobre los linfocitos CD4⁺ aislados mediante MACS de la lámina propia de biopsias intestinales frescas en cantidades equivalentes de los grupos TxIN y TxIRL.

Para cada perfil LTh, se tomó un factor de transcripción y una citoquina característica como referencia (*Figura 2.10*). Los LTh1 fueron evaluados mediante la expresión de *TBET* e *IFNG* (*Figura 2.10A*). El incremento respecto al control de *IFNG* fue de $2,0 \pm 0,9$ y $1,7 \pm 1,7$ veces en TxIN y en TxIRL, respectivamente. Mientras que estos valores resultaron comparables, la expresión de *TBET* se vio considerablemente afectada durante el RCA (TxIN= $1,7 \pm 0,7$; TxIRL= $0,2 \pm 0,1$; $p=0,05$). En el caso de los LTh2, se utilizaron los genes *GATA3* e *IL13* para caracterizarlos (*Figura 2.10B*). En estos se observó una disminución significativa en la expresión del factor de transcripción *GATA3* en el grupo TxIRL ($0,3 \pm 0,1$ veces) comparado con el grupo TxI sin rechazo ($2,0 \pm 0,6$ veces). *IL13* mostró un detrimento durante el RCA, sin embargo no resultó de importancia estadística. Los LTh17/22 comparten el factor de transcripción ROR γ t; por lo que se determinó la expresión del gen que lo codifica (*RORC*; *Figura 2.10C*) y el mismo mostró, al igual que *TBET* y *GATA3*, un nivel más bajo en TxIRL ($0,3 \pm 0,2$) que en el grupo TxI normal ($1,7 \pm 0,4$; $p=0,05$). El gen *IL17A*, por su parte, también se vio disminuido durante el RCA ($2,7 \pm 2,2$ vs $14,2 \pm 2,0$ en TxIN; $p=0,05$). *IL22*, de forma inversa, manifestó un incremento en TxIRL aunque sin significancia estadística. Para caracterizar a la población Treg, se evaluó la expresión de *FOXP3*, que resultó aminorada en RCA ($1,3 \pm 0,6$ vs $7,3 \pm 1,8$ en TxIN; $p=0,05$), y de *TGFB*, cuyos niveles de expresión en ambos grupos fueron similares.

A modo de resumen, todos los factores de transcripción se vieron afectados durante el RCA en comparación con el grupo TxIN e incluso respecto al grupo control sin trasplante. Las citoquinas, en cambio evidenciaron comportamientos diversos. En el caso de *IFNG* e *TGFB*, no se vieron modificadas. *IL13* e *IL17*, por su parte, se vieron disminuidas. No obstante, *IL22* en TxIRL mostró un aumento respecto a TxIN aunque no significativo. Estos resultados implican que hay un efecto de la inmunosupresión a nivel tisular de los linfocitos T CD4⁺, no obstante, hay todavía producción de IL-22 por parte de los LTh22.

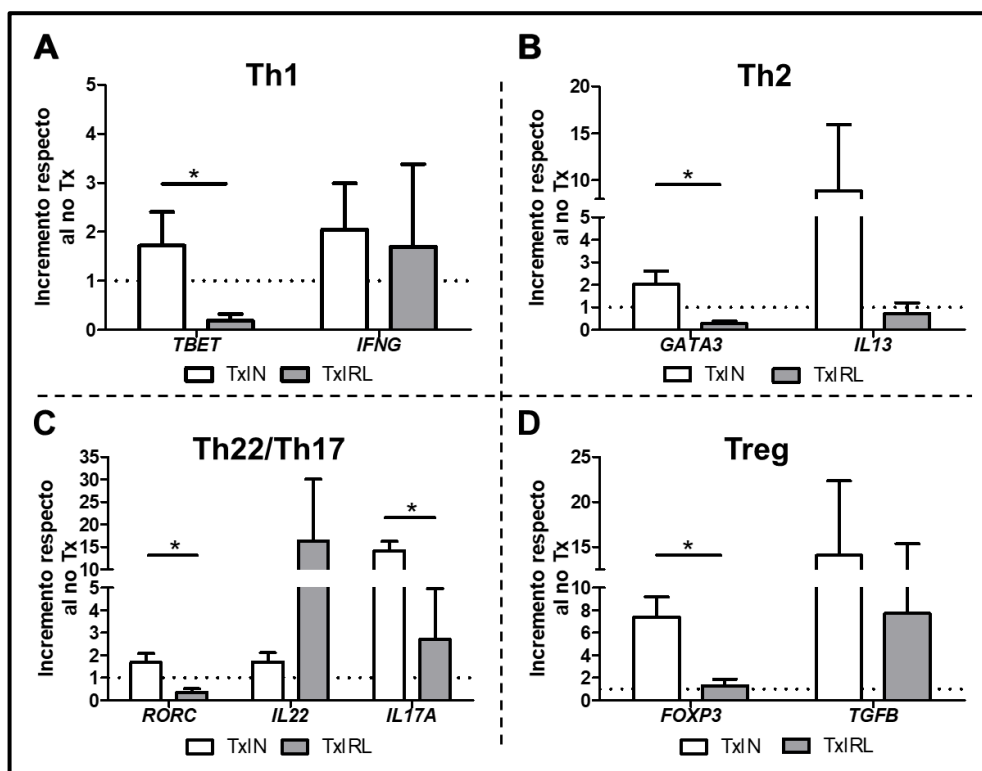
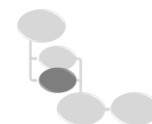
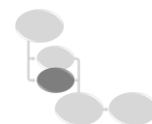


Figura 2.10: Perfiles de los LT CD4⁺ en el RCA posTxI. Mediante qPCR se evaluó el nivel de expresión génica de genes seleccionados que caracterizan a las distintas subpoblaciones de linfocitos Th en linfocitos CD4⁺ purificados de biopsias intestinales de los grupos TxIN (n=3) y TxIRL (n=3). A) LTh1 (TBET e IFNG). B) LTh2 (GATA3 E IL13). C) LTh17/22 (RORC, IL17 e IL22). D) Treg (FOXP3 y TGFB). La expresión de cada gen fue normalizada usando β -actina. El incremento fue calculado a través del método $\Delta\Delta C_t$, usando el promedio de los controles no Tx como referencia. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney a una cola. *, $P < 0,05$.

IV-Las células linfoides innatas y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

En varios trabajos en modelos animales, se ha descrito la interacción de las CLI3s con los linfocitos T a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMHII). Sonnenberg y colaboradores, demostraron la capacidad de las CLI3s de limitar la respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos para bacterias comensales de forma independiente a la secreción de citoquinas [298]. Por otro lado, Finke y colaboradores mostraron que las células CLI3 NCR⁻, una vez activadas, actúan como células presentadoras no clásicas e inducen la proliferación de linfocitos T [324].

Por lo expuesto, se decidió evaluar la expresión de las moléculas HLA de Clase II (HLA-DR) en la superficie de CLI3s en muestras de pacientes TxI, distinguiendo entre las subpoblaciones NCR⁺ y NCR⁻. Para ello se utilizó un anticuerpo anti HLA-DR humano conjugado a un fluorocromo para su detección mediante citometría de flujo. En la *Figura*



2.11A, se muestra una imagen representativa del diagrama de puntos para la expresión de HLA-DR en CLI3s.

En pacientes TxI, las células CLI3 que expresan moléculas HLA de clase II constituyen un $25,0 \pm 8,0 \%$ (Figura 2.11B). Vale destacar que, al analizar la expresión de HLA II subordinada a la de NKp44, se observó que la frecuencia de CLI3 NCR⁺ HLA-DR⁺ es mayor que la de CLI3 NCR⁻ HLA-DR⁺ ($39,1 \pm 16,9 \%$ y $12,3 \pm 3,0 \%$, respectivamente).

Los resultados obtenidos manifiestan la posibilidad de participación de las células linfoides innatas subgrupo 3 en la homeostasis intestinal en un modo citoquina-independiente.

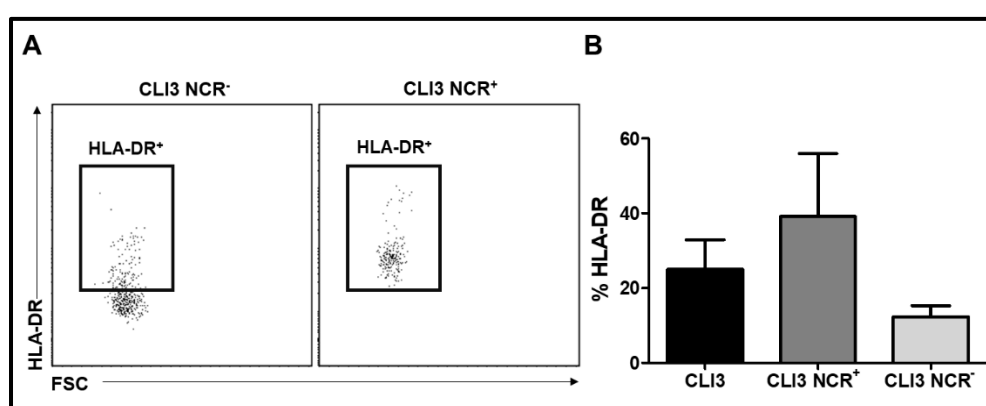
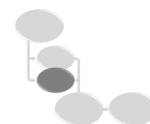


Figura 2.11: Expresión de moléculas HLA II en CLI3s en TxI. Análisis por citometría de flujo de células linfoides aisladas de biopsias frescas de pacientes trasplantados con histología normal (TxIN; n=4). A) Gráfico de puntos representativo de la expresión de moléculas de HLA-DR. B) Porcentaje de células que expresan moléculas de clase II en CLI3 totales, CLI3 NCR⁺ e CLI3 NCR⁻. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn.

V-CD56 vs NKp44 en CLI3s de amígdalas

La variedad de estrategias de identificación de las CLI3s, previas a la establecida y utilizada en este trabajo, dio lugar a trabajos que prestan a confusión cuando se los intenta comparar con resultados actuales. Para determinar si la expresión de CD56 es importante en la síntesis y secreción de citoquinas por las CLI3s, se realizó a modo de prueba piloto la purificación de dichas células en tres amígdalas a través de un citómetro de flujo con capacidad de *sorting*. Las subpoblaciones separadas fueron CLI3s NCR⁺ CD56⁺, CLI3s NCR⁺ CD56⁻, CLI3s NCR⁻ CD56⁺ y CLI3s NCR⁻ CD56⁻. Una vez purificadas, fueron incubadas en presencia y ausencia de PMA e ionomicina como inductores de la expresión y, luego, se evaluó mediante qPCR los niveles de los genes *IL17*, *IL22* y *CSF2* (Figura 2.12).



No fue posible determinar perfiles de expresión diferenciales entre las subpoblaciones evaluadas. Algunas de las muestras mostraron gran dispersión lo que produjo que no se encontraran diferencias significativas entre los grupos.

La acumulación de más muestras es necesario para determinar si CD56 influye de alguna manera en la expresión de citoquinas por las CLI3s. Sería interesante, también, poder purificarlas a partir de muestras intestinales y así evitar la posible variación que podría existir entre distintos tejidos.

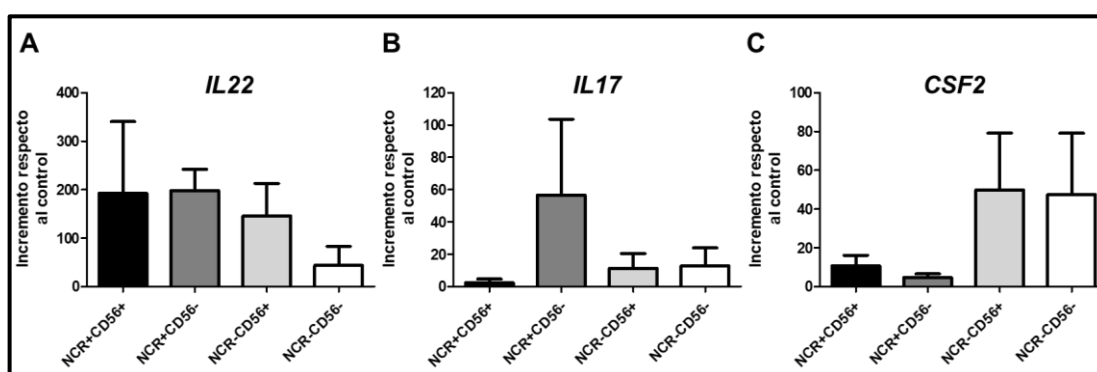
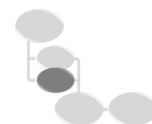


Figura 2.12: CD56 vs. NKp44 en CLI3s de amígdalas. Las distintas subpoblaciones de CLI3s (NCR⁺ CD56⁺, CLI3s NCR⁺ CD56⁻, CLI3s NCR⁻ CD56⁺ y CLI3s NCR⁻ CD56⁻) fueron purificadas a partir de leucocitos aislados de amígdalas mediante sorting por citometría de flujo. Se evaluó mediante qPCR la nivel de expresión de A) IL22, B) IL17 y C) CSF2 en cada una de ellas luego de 2hs de inducción a 37°C con PMA e inonomicina. La expresión de cada gen fue normalizada usando β -actina. El incremento fue calculado a través del método $\Delta\Delta C_t$, usando el promedio en la expresión de la población no inducida correspondiente como referencia. Los valores se muestran como Media \pm EEM y los grupos fueron comparados mediante la prueba ANOVA para medidas apareadas con el post-test Tukey.

Discusión

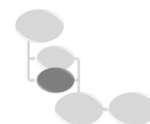
Aunque existen muchos componentes moleculares y celulares bien caracterizados del sistema inmune innato y adaptativo que participan en los procesos inflamatorios, la reciente caracterización de la familia de células linfoides innatas (CLIs) ha revelado un rol esencial para esta población en el inicio, regulación y resolución de la inflamación. En intestino, las CLIs del subgrupo 3 (CLI3s) tendrían un rol dominante en la reparación tisular. En el contexto inflamatorio del trasplante intestinal, y a pesar de que los pacientes son sometidos a esquemas de inmunosupresión agresivos, los procesos de RCA se producen con frecuencia, resultando de particular importancia el comprender la participación de esta particular población celular. En el presente trabajo se evaluó, en primera instancia, si existe un efecto directo de las drogas inmunosupresoras empleadas sobre las CLIs y, particularmente, en las CLI3s comparándolas con las células innatas clásicas. Nuestros resultados muestran que no hay una disminución en el porcentaje de CLIs y CLI3s totales en la lámina propia de pacientes



Txl comparados con pacientes sanos. La misma tendencia se evidencia en pacientes Txl en condiciones de rechazo leve. Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos por Meier y colaboradores, respecto al efecto del uso de inmunosupresión a largo plazo en la constitución y función de los folículos linfoides aislados también en pacientes Txl ^[325]. En otro estudio en pacientes con Txl, se mostró que el nivel de CLI3s presentes en el compartimiento intraepitelial se ven aumentados en comparación con pacientes normales ^[64]. Esta discrepancia puede deberse al análisis de un compartimiento intestinal diferente y también al modo de definir la población en cuestión. En el trabajo de Talayero, aunque se habla de CLI3s, sólo se describe un incremento de linfocitos CD3⁺, que expresan CD56, Nkp44, etc. No obstante, estos marcadores no son evaluados en forma conjunta.

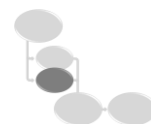
En la enfermedad de Crohn, por su parte, se observó una disminución de la subpoblación de CLI3s productora de IL-22 ^[38, 302] con el aumento, a expensas de ésta, de una población inducible por IL-23 con fenotipo de célula NK ^[302] y de las CLI1s, ambas productoras de IFN γ ^[38]. Ha sido descrito que las CLI3s tienen cierta plasticidad y, en función del contexto, pueden disminuir la expresión de ROR γ t, aumentar la de T-bet y secretar IFN γ como las CLI1s ^[37, 326]. Algunos autores llaman a estas células “ex CLI3s” y han demostrado que es un fenómeno irreversible ^[327, 328]. En nuestras muestras, las CLI1s resultaron las CLIs más abundantes pero no hubo diferencias entre los grupos con Txl y el no Tx. Geremia y colaboradores, observaron un aumento en la población CLI3 secretora de IL-17A, también en pacientes con Enfermedad de Crohn ^[304]. A pesar de que la mayoría del conocimiento sobre las CLIs proviene de estudios con modelos experimentales, en los últimos años han surgido gran cantidad de trabajos con muestras humanas. En patologías intestinales, parece haber una tendencia a observar una disminución de las CLI3s pro- homeostasis en pos de aquellas poblaciones con perfiles inflamatorios tales como CLI1 o CLI3 NCR⁻. Nuestros resultados indicarían un comportamiento similar en el RCA posTxl.

Recientemente, se ha observado que existe una relación directa entre la expresión de la proteína de superficie Nkp44 en CLI3s y su capacidad productora de IL-22. En contraparte, la subpoblación Nkp44⁻ (NCR⁻) produce mayoritariamente IL-17^[329]. Por lo tanto, la proporción de CLI3s NCR⁺/NCR⁻ tiene incidencia en el perfil pro-reparación o inflamatorio de un proceso inmunitario. En nuestra serie de pacientes, se evidenció una notable disminución de los CLI3s NCR⁺ en muestras de Txl con rechazo agudo leve comparadas con las de pacientes trasplantados sin evidencia de rechazo. En consistencia con este último resultado, el nivel de expresión de IL-22 en lámina propia de pacientes con rechazo se vio notablemente disminuido. No obstante, para atribuirle esta reducción a la baja frecuencia de CLI3s NCR⁺, hacía falta evaluar la producción de citoquinas por linfocitos Th. Para ello, en linfocitos CD4⁺



purificados de las mismas muestras donde se analizaron las CLI3s medimos los niveles de expresión de *IFNG*, *IL13*, *IL22*, *IL17* y *TGFB*. También se estimaron los niveles de expresión de los factores de transcripción necesarios para la diferenciación de las distintas subpoblaciones de LTh. Estos últimos evidenciaron un descenso en el grupo TxIRL comparado con los trasplantados normales, probablemente debido a la intensificación del tratamiento inmunosupresor ante el evento de RCA. Las citoquinas, por el contrario, se mantuvieron inalteradas como en el caso de *IFNG* y *TGFB* o disminuidas como *IL17* e *IL13*. *IL22*, de manera contraria, evidenció un leve aumento durante el RCA aunque no significativo. A pesar de este incremento, los niveles de *IL22* totales en las biopsias se vieron disminuidos en el rechazo. Por lo que, posiblemente la carencia de ésta se deba a la disminución en los CLI3s secretores de dicha citoquina. La *Figura 2.13* esquematiza el comportamiento del eje IL-22/IL-22R durante el RCA según los resultados del trabajo. No obstante, la purificación de dichas células de lámina propia de pacientes TxI y la estimación de los niveles de citoquinas producidas por ellas son necesarios para la confirmación inequívoca de este hallazgo. Ha sido reportado un aumento en la expresión de NKp44 y de la secreción de IL-22 en linfocitos intraepiteliales (LIE) CD3⁺ en pacientes TxI. No obstante, no se evaluó la prevalencia de dicha población en el contexto del RCA^[64]. Munneke y su grupo, mostraron un menor número de células CLI3 en sangre de pacientes con trasplante de médula ósea que desarrollan EICH, en comparación con pacientes que no presentan dicha complicación ^[276]. En modelos animales de esta patología, se observó que la administración externa de IL-22 induce la recuperación de las células madre intestinales que fueron dañadas y mejora los signos histológicos ^[321].

Si bien este trabajo sienta las bases para comenzar a comprender el rol de las CLI3s en el contexto del TxI, es necesario seguir profundizando en los mecanismos que regulan sus diversas funciones que, incluso, pueden ser antagónicas. La limitada cantidad de muestras de RCA, no nos permitió realizar estudios de funcionalidad que brinden más información que la caracterización fenotípica. Muestras con mayor severidad de RCA, nos hubiesen dado la posibilidad de evaluar cómo se comporta esta población celular en condiciones de inmunosupresión más altas y en un contexto inflamatorio aún mayor. Las biopsias de RCA que incluimos, sólo presentan características histológicas de RCA leve. Esto se debe a que la mayoría de los eventos de rechazos se producían como urgencias y no durante el protocolo de seguimiento, por lo que sólo teníamos acceso a las muestras posteriores que ya poseían tratamiento e incluso podían haber revertido el cuadro. En estudios complementarios a éste, y a fin de salvar esta limitación, se utilizarán modelos de RCA en organoides intestinales humanos.



A pesar de que el mecanismo de acción mejor descrito de las CLI3s es una rápida respuesta a citoquinas y a señales microbianas con la producción de citoquinas inmunoregulatorias, se le ha conferido, a partir de investigaciones de los últimos años, la capacidad de modular la respuesta adaptativa de un modo citoquina-independiente ^[323]. Esta actividad es mediada por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II. A modo de experimento piloto, evaluamos la expresión de dichas moléculas en CLI3s de pacientes TxI. Observamos que en el contexto del trasplante intestinal, las CLI3s expresan HLA-DR en su superficie preferencialmente en el subgrupo CLI3s NCR⁺. En modelos experimentales, se les ha atribuido a las ILC3 la capacidad de modular la respuesta de linfocitos T CD4⁺ a bacterias comensales ^[298], así como también, la de inducir la respuesta T específica después de su estimulación tanto in vitro como in vivo ^[324]. En este último caso, se trata de ILC3s NCR⁻ periféricos ^[324]. En un estudio sobre enfermedad de Crohn se ha visto una disminución de la expresión de moléculas HLA de clase II contribuyendo a la patología ^[311]. Si la disminución en los CLI3s NCR⁺ en pacientes TxI con RCA implica falta de tolerancia hacia bacterias comensales o si la preponderancia de la subpoblación NCR⁻ resulta en una respuesta inflamatoria exacerbada será objeto de nuestros próximos estudios. Podemos así proponer que el eje IL-22/IL-22R constituye una alternativa a explorar como complementaria a las terapias inmunosupresoras en el trasplante TxI, mientras que el eje ILC3s-CMH II-Linfocitos T representa una opción a estudiar para inducir la tolerancia.

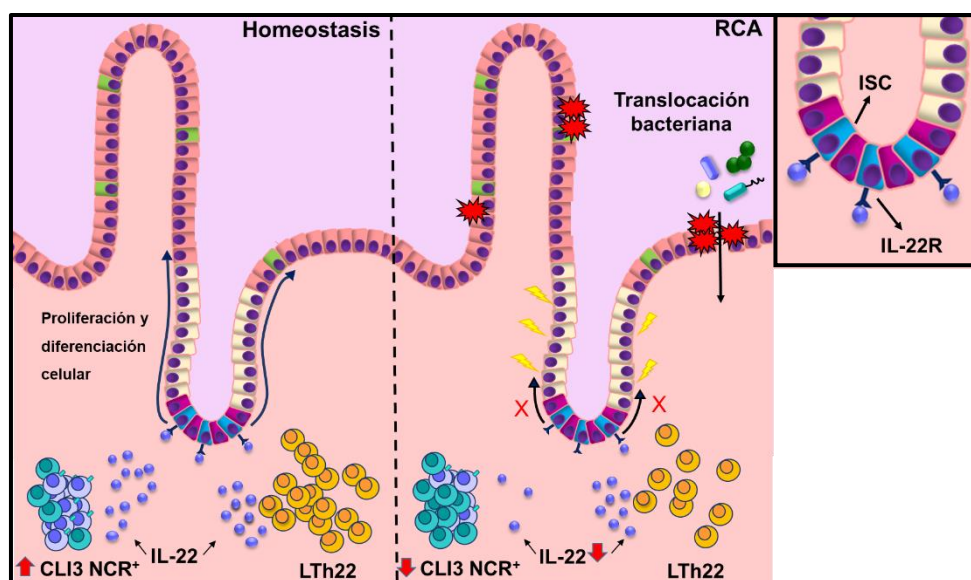
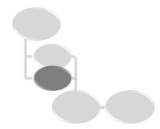
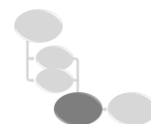


Figura 2.12: El eje IL-22/IL-22R en el RCA posTxI. Se ilustran los principales productores de IL-22 en la lámina propia intestinal en situación de homeostasis (izquierda) y durante el RCA (derecha). La unión de la IL-22 a su receptor en las células madre intestinales (ISC) desencadena la proliferación y diferenciación celular. En condiciones de RCA, las CLI3 NCR⁺ disminuyen y el nivel del IL-22 en lámina propia conduciendo a una reparación epitelial ineficiente. De esta manera, se puede producir la translocación bacteriana y, consecuentemente, aumenta el riesgo de sepsis. Los rayos indican la injuria producida por los linfocitos T en la zona de amplificación en tránsito. CLI3s, células linfoides innatas subgrupo 3; LTh22, linfocito CD4⁺ secretor de IL-22; RCA, rechazo celular agudo; IL-22R, receptor de IL-22.



Los avances en el conocimiento de la inmunología del rechazo intestinal y la compleja interacción con la microbiota comienzan a plantear la posible necesidad de modificar la terapéutica a una forma multifacética, donde no solo se utilicen drogas inmunosupresoras, sino también antibióticos y estimulantes de la proliferación endotelial^[329].



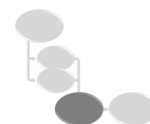
DISCUSIÓN GENERAL

El intestino fue uno de los primeros órganos en ser trasplantado en modelos experimentales [194, 195] y el último en ser injertado con éxito en humanos.

A pesar de los numerosos intentos, desde el primer trasplante intestinal aislado en humanos en 1964 hasta el año 1987, no hubo casos clínicos en donde la funcionalidad del injerto intestinal haya sido comprobable [330]. Esta etapa se corresponde con la era previa a la aparición de las drogas inmunosupresoras que interrumpen la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos T. La primera de ellas en surgir fue la ciclosporina (CsA) y se aplicó con buenos resultados tempranos en los primeros trasplantes multiviscerales [196] y combinados [331], siendo éstos los primeros en reportar supervivencia aunque no alejada. No obstante, no fue hasta la aplicación del tacrolimus con sus resultados promisorios que el TxI comenzó a verse como una alternativa factible [211].

La inmunogenicidad del intestino representó y representa el mayor obstáculo para la aplicabilidad de este trasplante [205]. Si bien esta característica tiene un origen multifactorial, podemos nombrar tres aspectos que son determinantes: 1) las células epiteliales intestinales pueden actuar como células presentadoras de antígenos (CPA), en ciertas ocasiones, y activar linfocitos aloreactivos del receptor [332]; 2) posee gran cantidad de CPAs residentes, de forma similar a la piel y el pulmón, y el aloconocimiento entre ellas y los linfocitos del receptor se produce en el contexto de los tejidos linfoides secundarios del injerto; 3) el intestino cuenta con un bien desarrollado sistema inmune innato y se encuentra en un estado permanente de inflamación “controlada”, debido a la exposición constante a antígenos extraños y a la microbiota [206]. Por todo lo dicho, la incidencia de las complicaciones inmunológicas postrasplante, tales como rechazo, EICH e infecciones, es alta y se requiere un delicado manejo del régimen de inmunosupresión de forma individual en cada paciente [185, 192].

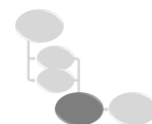
Hoy, treinta años después de esos primeros intentos de implementación clínica, el trasplante intestinal constituye una opción terapéutica válida para aquellos pacientes con insuficiencia intestinal crónica e irreversible que han desarrollado complicaciones a la nutrición parenteral [185]. Esto se debió al avance en las terapias inmunosupresoras, la estandarización de los procedimientos quirúrgicos y la mejora en los cuidados posoperatorios [200]. Sin embargo, como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el rechazo celular agudo (RCA) se sigue produciendo con frecuencia afectando la sobrevida posterior del injerto y del mismo paciente [188, 239, 240]. El esfuerzo mancomunado de la comunidad científica y clínica en el área está mayormente enfocado en la búsqueda de la inducción de la tolerancia del injerto intestinal, de blancos celulares para nuevas terapéuticas que complementen a las drogas



inmunosupresoras y de indicadores para el monitoreo del injerto de modo no invasivo, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

A raíz de ello, el presente trabajo de tesis se avocó a la generación de conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el rechazo celular agudo postTxI en humanos y, así, tratar de contribuir al entendimiento de los aspectos antes mencionados.

En el Capítulo 1, titulado ***“Análisis de los blancos celulares del rechazo celular agudo en la cripta intestinal”***, se abordó la temática desde el punto de vista de los efectos que el RCA tiene sobre el tejido intestinal. Los linfocitos T median la alorespuesta contra los antígenos expresados en el injerto causando la apoptosis de las células blanco [86, 87, 96]. La apoptosis, se evidencia en las biopsias evaluadas para el monitoreo del injerto como cuerpos apoptóticos [213]. El recuento de estos últimos en el epitelio críptico, es uno de los criterios más importantes, junto al daño a nivel del epitelio vellositario y el infiltrado inflamatorio, para el diagnóstico de rechazo. Esto indica que las criptas son blanco del RCA, ahora bien, no había referencias acerca del cuál es el tipo celular afectado dentro de ellas. Las criptas intestinales se dividen en la zona del fondo (ZF), compuesta por las células de Paneth y las células madre intestinales (ISC), y la zona de amplificación en tránsito (ZAT) que está constituida por intermediarios de diferenciación de las células epiteliales intestinales [6]. Con el objeto de determinar cuáles son los blancos celulares en la mucosa intestinal del RCA, se analizaron mediante inmunohistología las poblaciones celulares componentes de la cripta en biopsias de pacientes TxI con histología normal y con evidencias de rechazo leve, moderado y severo. La detección de defensina 5 (DEFA5) nos permitió evaluar el número de células de Paneth. El mismo no sufrió un detrimento significativo aún en eventos de RCA moderado. En muestras con RCA severo, donde había serio compromiso del compartimiento epitelial en general, aún se pudieron observar células de Paneth viables. A través del análisis de expresión de genes que corresponden a péptidos antimicrobianos producidos por estas células se confirmaron los resultados anteriores y, además, se demostró que tampoco se ven afectadas en funcionalidad. En contraposición a nuestros hallazgos, se ha mostrado en modelos experimentales de EICH [261] e injuria por isquemia-reperfusión las células de Paneth se ven seriamente dañadas [268]. Nosotros, confrontamos estos resultados con nuestra propia pequeña serie de muestras con EICH e IIR. Mientras que prácticamente no se detectaron células de Paneth en las biopsias con EICH, en las muestras con IIR están intactas aún en una escala de Park 5. Desde el punto de vista clínico, al menos para el trasplante intestinal, este es el máximo nivel de daño observado y se recupera totalmente en una semana.

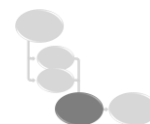


Luego, usando las células de Paneth como marcador de la ZF, vimos que se pueden contabilizar mayor cantidad de cuerpos apoptóticos en la ZAT. Esto indicaría que esta zona sería la más afectada por el RCA, en concordancia con la disminución en los progenitores de células endocrinas en muestras de pacientes TxI con RCA leve publicado por Fishbein y colaboradores ^[263]. De igual manera, se constató el estado de las ISC mediante detección de IL-22R en cortes de biopsias intestinales normales y con las distintas severidades de rechazo. Este receptor es expresado, en menor medida, en otras células epiteliales ^[260], por lo que se definieron a las ISC como aquellas células IL-22R⁺ que estuvieran intercaladas entre las células de Paneth. No se vieron modificaciones en el número de las mismas y aún pudieron ser detectadas en muestras con RCA severo. La expresión de *LGR5* (marcador de ISC) e *IL22R*, se mantuvo constante e incluso mostró un pequeño aumento en este último durante RCA moderado en comparación con muestras normales. Mediante el marcador de proliferación Ki-67 se evaluó la capacidad proliferativa de las mismas que permaneció inalterada.

Si bien el foco de este trabajo fue la identificación de las células blanco en la mucosa intestinal, queda para investigaciones futuras la identificación de posibles blancos endoteliales a nivel de los capilares que sostienen las vellosidades. Ya que, quizás sea el efecto conjunto de ambos procesos lo que lleve al desmoronamiento de las vellosidades durante el RCA.

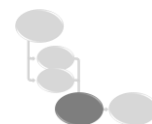
En EICH, del mismo modo que las células de Paneth, las ISC se ven afectadas según los resultados reportados ^[261] y los que pudimos obtener en nuestra serie. La diferencia con el RCA puede deberse a que las muestras corresponden principalmente a duodeno y las de TxI a íleon distal y al efecto de la quimioradioterapia del Tx de médula ósea en el intestino. Sería interesante, para próximos estudios, comparar nuestra serie de resultados con muestras provenientes de EICH secundario a TxI. En nuestra serie de IIR las células madre también se muestran sin alteraciones, probablemente a esto se deba la rápida recuperación de los signos histológicos.

Las ISC, como se ha señalado, expresan en su superficie IL-22R ^[260]. El ligando de este receptor, la IL-22, es una citoquina que tiene como función general el mantenimiento de la homeostasis intestinal ^[289, 312]. Particularmente, al unirse a su receptor sobre las ISC, induce la proliferación y diferenciación celular ^[321]. Este hecho es clave en el proceso de recambio de células epiteliales intestinales en condiciones normales, pero también en la regeneración ante eventos de injuria ^[312]. Hasta hace algunos años, se consideraba que la única fuente de esta citoquina a nivel de la mucosa intestinal eran los LTh22 ^[26]. Sin embargo, la descripción de las células linfoides innatas subgrupo 3 (CLI3s) como las mayores productoras de IL-22 por



publicaciones recientes propone un cambio de paradigma. Podemos, de esta manera, vincular esto al Capítulo 2: ***“Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en el trasplante intestinal”***. En esta sección, la atención se centró sobre los efectores de la inmunidad y, particularmente, sobre las CLI3s. Esta novedosa población celular tiene gran incidencia a nivel intestinal a pesar de su baja representación ^[284]. Las CLI3s pueden producir IL-22 ^[42], como ya se ha mencionado, pero también secretar IL-17 y exacerbar el estado inflamatorio del tejido ^[286] ^[322]. La bibliografía reciente en el tema indica que este rol antagónico está determinado por la expresión de NKp44, el receptor de activación de las células NK ^[297]. Para evaluar si existe algún efecto de la inmunosupresión y del RCA postTxI que determine el perfil adoptado por estas células, se procedió a identificarlas mediante citometría de flujo en biopsias intestinales frescas de pacientes no sometidos a Tx (Control) y de pacientes trasplantado con histología normal y con evidencia de rechazo. En este caso, todas las muestras con RCA fueron diagnosticadas como leves. Las frecuencias de las células linfoides innatas (CLIs) totales y de las NKs no se modificaron entre los grupos TxI, normales o con RCA, y los obtenidos para los controles. No obstante, las células NK mostraron un perfil más activado en el RCA conforme al contexto inflamatorio. Las CLIs están compuestas por las CLI1s que secretan IFN γ , las CLI2s que producen IL-13 e IL-5 y las CLI3s ^[35]. En ninguno de los grupos estudio hubo variaciones en la composición de esta familia. Por ende, podemos decir que las CLI3s no sufren un efecto directo secundario a la terapia inmunosupresora y, durante los eventos de rechazo, tampoco se ven particularmente afectadas. Posteriormente, se analizó qué porcentaje de estas células tenían un perfil pro-reparación (NCR⁺) o pro-inflamatorio (NCR⁻) ^[297]. Mientras que entre el grupo sin Tx y el grupo TxI sin rechazo no hubo diferencias, el grupo con RCA leve evidenció una disminución significativa de la población NCR⁺ en favor de la NCR⁻. En trabajos sobre la enfermedad de Crohn, se ha observado esta misma tendencia ^[302, 304, 311, 328]. Si bien algunos de ellos reportan, a costa de esa disminución, un aumento en células productoras de IFN γ ^[302, 328], otros, informaron un aumento de la subpoblación de CLI3s productora de IL-17^[304]. Sin embargo, en líneas generales, la disminución de cierta subpoblación de CLI3s implicó que se exacerben los procesos inflamatorios. Pacientes con mayor incidencia de EICH secundaria a Tx de médula ósea, poseen un menor número de CLI3s en sangre ^[306]. Talayero y colaboradores, en cambio, reportaron un aumento de células linfoides CD3⁻ NKp44⁺ en el compartimiento epitelial de pacientes TxI ^[64]. No obstante, estas células podrían no corresponderse enteramente con el fenotipo CLI3s y tampoco fueron evaluadas durante el RCA.

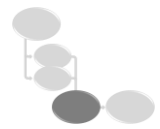
Con el objeto de valuar la incidencia de esta disminución de CLI3s NCR⁺ en la expresión de IL-22 en la lámina propia, se midió el nivel de expresión del gen *IL22* mediante qPCR en muestras de trasplante con y sin RCA. El mismo exhibió una disminución muy importante en



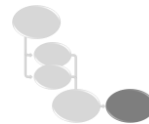
las muestras con RCA, aunque estadísticamente no se pueda apreciar debido a la dispersión de la población de estudio. Para determinar si ese detrimento en *IL22* se corresponde con el estado de la población CLI3s en el RCA, hubo que evaluar el perfil secretorio de los LT CD4⁺. Con este fin, se analizaron los niveles de expresión de todas las citoquinas características de las distintas subpoblaciones LTh sobre LT CD4⁺ purificados de lámina propia. Los genes *IFNG*, *IL13*, *IL17* y *TGFB* no mostraron modificaciones en el grupo con rechazo respecto al normal; por el contrario, *IL22* se vio levemente aumentado. Si a pesar de este incremento, el nivel de citoquina total disminuyó, otra población tiene gran influencia y ellas son las CLI3s. De forma similar, el grupo de Talayero, reportó un aumento en la expresión de NKp44 y de *IL-22* en el compartimiento intraepitelial de biopsias TxI ^[64]. Sin embargo, las mismas consideraciones antes realizadas sobre este trabajo también deben ser aplicadas aquí.

Las CLI3s, también limitan la respuesta T por una vía citoquina-independiente ^[298, 299]. Este proceso es mediado a través de las moléculas del CMH de clase II. Dado que la expresión de dichas moléculas de superficie no fue evaluada sobre estas células en el contexto del TxI, incorporamos al esquema de identificación regular el uso de un anticuerpo anti-HLA DR a modo de prueba piloto. Se observó que las CLI3s expresan moléculas de clase II, no obstante esta expresión es preferencial en las CLI3 NCR⁺ que se hayan deterioradas en el RCA. En modelos experimentales, mientras que una subpoblación es capaz de controlar la respuesta CD4 contra bacterias comensales, los CLI3s NCR⁻ pueden inducir la respuesta T ^[298, 299]. La disminución de HLA II en CLI3s en la enfermedad de Crohn se asoció a un agravamiento de la patología ^[311]. Sería de gran relevancia, para comprender aún más el comportamiento de estas células en nuestro sistema, analizar si las células expresan o no en su superficie moléculas co-estimuladoras. Es ahí donde puede radicar la diferencia entre inducir la respuesta T y provocar anergia. Por lo dicho, las CLI3s constituyen un blanco a explorar a fin de la tolerancia del injerto intestinal.

La limitación más grande con la que nos encontramos en este estudio es el bajo número de muestras. Esto es debido, mayormente, a una disminución en los TxI realizados en nuestro centro contemporánea al inicio de este trabajo ^[166]. Esto es debido al mayor éxito alcanzado con la aplicación de nuevos procedimientos de rehabilitación médica y quirúrgica; similar tendencia a favor de la rehabilitación ocurrió a nivel mundial. ^[202, 203]. Las cirugías de reconstrucción autóloga ^[172] y ciertos tratamientos, entre los que se distingue el uso de teduglutide ^[177], han permitido que ciertos pacientes con síndrome de intestino corto se independicen de la nutrición parenteral y sin los efectos adversos del uso de drogas inmunosupresoras de por vida que acompañan al TxI ^[178, 180, 181]. Sin embargo, la eficacia de estos métodos de rehabilitación depende de la naturaleza del segmento de intestino



remanente, la longitud del mismo, entre otras variables. Además, algunos pacientes se ven imposibilitados de acceder a estas alternativas por la naturaleza de la patología subyacente a la insuficiencia intestinal. Esto da lugar a un grupo de pacientes con insuficiencia intestinal crónica e irreversible cuya única alternativa para mejorar su calidad de vida sigue siendo el trasplante intestinal. Para ellos, este trabajo.

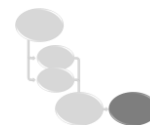


CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, se desprenden las conclusiones finales enunciadas a continuación. Las mismas, estarán divididas de acuerdo al capítulo en el cual se desarrolló la problemática.

Capítulo 1 “Análisis de los blancos celulares del rechazo celular agudo en la cripta intestinal”:

- La zona de amplificación en tránsito de la cripta intestinal es más afectada que la zona del fondo durante los eventos de RCA, por lo que el blanco principal del mismo son los intermediarios de diferenciación de las células epiteliales intestinales.
- Las células de Paneth no se ven perjudicadas en número, así como tampoco en funcionalidad, durante estadios tempranos del RCA.
- Las células madre intestinales no se ven disminuidas y retienen su capacidad proliferativa en las etapas iniciales del RCA.
- Las células madre expresan el receptor de IL-22 de forma similar en el RCA y en los controles.
- Aún en eventos de RCA severo, con gran compromiso de la arquitectura de la mucosa intestinal, se hallaron células de Paneth y células madre intestinales viables.
- En el proceso de injuria por isquemia reperusión, producido durante el procedimiento de Txl, las células blanco no son las células de fondo de la cripta como ocurre en el RCA.
- Las células de Paneth y las células madre intestinales en la enfermedad de injerto contra huésped se ven claramente dañadas, aún en etapas tempranas de la misma.



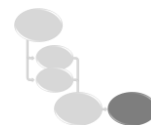
Capítulo 2 “Rol de las células linfoides innatas subgrupo 3 en el trasplante intestinal”:

- Las frecuencias de las células NK y las células linfoides innatas no se ven modificadas por los esquemas de inmunosupresión utilizados en forma crónica y tampoco durante el tratamiento del RCA.
- Las CLI3s NCR⁺ disminuyen en el RCA, con el consecuente aumento de la subpoblación NCR⁻.
- Los niveles de IL-22 se ven disminuidos en el RCA a consecuencia del cambio de perfil de las CLI3s más que por las variaciones de los LTh.
- Las células CLI3s expresan moléculas HLA de Clase II, lo que les permitiría interactuar con la inmunidad adaptativa.

Los resultados de este trabajo de tesis dieron lugar a varios hallazgos que abren nuevas líneas de investigación en la temática, los cuáles fueron mencionados a lo largo del manuscrito.

Sin embargo, la línea que resultó de mayor interés y de puesta en marcha casi inmediata es aquella que explora el eje IL-22/IL-22R como estimulador de mecanismos de regeneración y preservación del tejido. En varios modelos animales se mostró con éxito la aplicación de IL-22 recombinante como terapia protectora para limitar la colitis ^[333], controlar la infección masiva con *Citrobacter rodentium* ^[290, 291], reducir la translocación sistémica de bacteria comensales intestinales ^[296] y mejorar los signos histológicos intestinales de la EICH ^[260]. En humanos, ya se produce el F-652, una proteína de fusión constituida por la proteína recombinante IL-22 y IgG2a. El objetivo primario para su producción fue reducir la incidencia de EICH en pacientes con trasplante de médula ósea. Este compuesto es utilizado en dos ensayos clínicos Ila (ClinicalTrials.gov NCT02406651 y NCT02655510), por lo que la importancia de este mecanismo ya ha sido reconocida en otros contextos.

Este estudio permitió comprobar que el eje IL-22/IL-22R, en el RCA posTxI, se halla interrumpido. Mientras que las ISC expresan el IL-22R en su superficie y se encuentran perfectamente activas, la producción de su ligando a nivel de la lámina propia intestinal está disminuida. Sus productores principales, las CLI3s, muestran un cambio de fenotipo que se asocia a este detrimento en IL-22. Para continuar estudiando si existe la posibilidad de que la IL-22 constituya una nueva alternativa terapéutica o sea complementaria a otras drogas



utilizadas en la actualidad en los casos de rechazo en trasplante intestinal humano, se escribió el proyecto “Estudio del mecanismo regenerativo mediado por la citoquina IL-22 y su productor principal, las células linfoides innatas del subgrupo 3 (CLI3) sobre el epitelio intestinal”¹. El mismo plantea estudiar el efecto regenerativo y protector de los CLI3 y la IL-22 en el epitelio intestinal en un modelo *ex-vivo* de organoides intestinales humanos y evaluar la aplicación de IL-22 recombinante como factor protector frente al rechazo celular agudo en un modelo de trasplante intestinal heterópico y alogénico en ratas. Además, se incluirá el estudio de las implicancias de la IL-22 en la regeneración de la microcirculación vellocitaria y la reparación del daño endotelial producido durante el RCA.

¹ Este proyecto, consiguió financiación por parte de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2016-3677) y será iniciado en el corriente año.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robbins S, Cotran R, Kumar V. **Patología humana**. 9 ed: Elsevier; 2013.
2. Tortora GJD, Tortora BGJ, Derrickson B. **Principios de anatomía y fisiología**. 2013.
3. VanPutte C. **Seeley's anatomy & physiology**. McGraw-Hill Higher Education; 2016.
4. Gondolessi G, Ramisch D, Padin J, Almau H, Sandi M, Schelotto P, et al. **What Is the Normal Small Bowel Length in Humans? First Donor-Based Cohort Analysis**. *American Journal of Transplantation* 2012; 12(s4).
5. Andersson-Rolf A, Zilbauer M, Koo B-K, Clevers H. **Stem Cells in Repair of Gastrointestinal Epithelia**. *Physiology* 2017; 32(4):278-289.
6. Clevers H. **The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment**. *Cell* 2013; 154(2):274-284.
7. Creamer B, Shorter R, Bamforth J. **The turnover and shedding of epithelial cells**. *Gut* 1961; 2(2):110-116.
8. Snippert HJ, Van Der Flier LG, Sato T, Van Es JH, Van Den Born M, Kroon-Veenboer C, et al. **Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells**. *Cell* 2010; 143(1):134-144.
9. Cheng H, Leblond CP. **Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types**. *The American journal of anatomy* 1974; 141(4):537-561.
10. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. **Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system**. *Nature* 2012; 489(7415):231-241.
11. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell M. **Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue**. *Mucosal immunology* 2008; 1(1):31-37.
12. Mestecky J, Lamm ME, Ogra PL, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, et al. **Mucosal immunology**. Academic Press; 2005.
13. Pabst O, Herbrand H, Worbs T, Friedrichsen M, Yan S, Hoffmann MW, et al. **Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes**. *European journal of immunology* 2005; 35(1):98-107.
14. Owen RL, Jones AL. **Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles**. *Gastroenterology* 1974; 66(2):189-203.
15. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl J-P. **Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses**. *Annual review of immunology* 1996; 14(1):275-300.
16. Tsuji M, Suzuki K, Kitamura H, Maruya M, Kinoshita K, Ivanov II, et al. **Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut**. *Immunity* 2008; 29(2):261-271.
17. Lorenz RG, Newberry RD. **Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1029(1):44-57.

18. Cornes J. **Peyer's patches in the human gut**. In: SAGE Publications; 1965.
19. Withers DR, Hepworth MR. **Group 3 Innate Lymphoid Cells: Communications Hubs of the Intestinal Immune System**. *Frontiers in immunology* 2017; 8:1298.
20. Fu Y-X, Chaplin DD. **Development and maturation of secondary lymphoid tissues**. *Annual review of immunology* 1999; 17(1):399-433.
21. Cyster JG. **Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs**. *Science* 1999; 286(5447):2098-2102.
22. Tilney NL. **Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat**. *Journal of anatomy* 1971; 109(Pt 3):369.
23. Houston S, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat A, Milling S. **The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct**. *Mucosal immunology* 2016; 9(2):468-478.
24. Persson EK, Scott CL, Mowat AM, Agace WW. **Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function**. *European journal of immunology* 2013; 43(12):3098-3107.
25. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, et al. **Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets**. *Immunity* 2013; 38(1):187-197.
26. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. **The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells**. *Cell* 2006; 126(6):1121-1133.
27. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. **Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10**. *Nature immunology* 2007; 8(9):931-941.
28. Wolff MJ, Leung JM, Davenport M, Poles MA, Cho I, Loke Pn. **TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum**. *PloS one* 2012; 7(7):e41373.
29. Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, Martin E, Soudais C, Lantz O. **Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function**. *Trends in immunology* 2011; 32(5):212-218.
30. Brandtzaeg P. **Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation**. *Immunological investigations* 2010; 39(4-5):303-355.
31. Brandtzaeg P, Johansen FE. **Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties**. *Immunological reviews* 2005; 206(1):32-63.
32. Suzuki K, Ha S-a, Tsuji M, Fagarasan S. **Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut**. In: *Seminars in immunology*: Elsevier; 2007. pp. 127-135.
33. Kett K, Brandtzaeg P, Radl J, Haaijman J. **Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues**. *The Journal of Immunology* 1986; 136(10):3631-3635.

34. Crago S, Kutteh W, Moro I, Allansmith M, Radl J, Haaijman J, et al. **Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues.** *The Journal of Immunology* 1984; 132(1):16-18.
35. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. **Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature.** *Nature Reviews Immunology* 2013; 13(2):145-149.
36. Klose CS, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. **Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages.** *Cell* 2014; 157(2):340-356.
37. Klose CS, Kiss EA, Schwierzeck V, Ebert K, Hoyler T, d'Hargues Y, et al. **A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR [ggr] t+ innate lymphoid cells.** *Nature* 2013; 494(7436):261-265.
38. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, Te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. **Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues.** *Nature immunology* 2013; 14(3):221-229.
39. Pulendran B, Artis D. **New paradigms in type 2 immunity.** *Science* 2012; 337(6093):431-435.
40. Spencer S, Wilhelm C, Yang Q, Hall J, Bouladoux N, Boyd A, et al. **Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity.** *Science* 2014; 343(6169):432-437.
41. Zaiss DM, Yang L, Shah PR, Kobie JJ, Urban JF, Mosmann TR. **Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes.** *Science* 2006; 314(5806):1746-1746.
42. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, et al. **A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity.** *Nature* 2009; 457(7230):722-725.
43. Crellin NK, Trifari S, Kaplan CD, Cupedo T, Spits H. **Human NKp44+ IL-22+ cells and LTi-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2010;jem. 20091509.
44. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, et al. **Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells.** *Nature immunology* 2009; 10(1):66-74.
45. Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. **Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1996; 44(7):721-731.
46. Bain CC, Mowat AM. **The monocyte-macrophage axis in the intestine.** *Cellular immunology* 2014; 291(1):41-48.
47. Müller AJ, Kaiser P, Dittmar KE, Weber TC, Haueter S, Endt K, et al. **Salmonella gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes.** *Cell host & microbe* 2012; 11(1):19-32.
48. Rani R, Smulian AG, Greaves DR, Hogan SP, Herbert DBR. **TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function.** *European journal of immunology* 2011; 41(7):2000-2009.
49. Ueda Y, Kayama H, Jeon SG, Kusu T, Isaka Y, Rakugi H, et al. **Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10.** *International immunology* 2010; 22(12):953-962.

50. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. **Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria.** *Immunity* 2011; 34(2):237-246.
51. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. **T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.** *Immunology today* 1999; 20(12):561-567.
52. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, Baumjohann D, Morton J, Kim SJ, et al. **Transcriptional and functional profiling of human intestinal dendritic cells reveals conserved specialization and a role for Bcl-6 and Blimp-1 in terminal subset differentiation.** *Nature immunology* 2014; 15(1):98.
53. Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, et al. **CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(15):6347-6352.
54. Yrlid U, Milling SW, Miller JL, Cartland S, Jenkins CD, MacPherson GG. **Regulation of intestinal dendritic cell migration and activation by plasmacytoid dendritic cells, TNF- α and type 1 IFNs after feeding a TLR7/8 ligand.** *The Journal of Immunology* 2006; 176(9):5205-5212.
55. Yrlid U, Cerovic V, Milling S, Jenkins CD, Zhang J, Crocker PR, et al. **Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph.** *The Journal of Immunology* 2006; 177(9):6115-6121.
56. Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. **Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract.** *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(12):1719.
57. Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, et al. **Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis.** *Immunity* 2014; 40(4):582-593.
58. Bischoff SC. **Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells.** In: *Seminars in immunopathology*: Springer; 2009. pp. 185-205.
59. Yu LC, Perdue MH. **Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress.** *Immunological reviews* 2001; 179(1):61-73.
60. Lloyd G, Green F, Fox H, Mani V, Turnberg L. **Mast cells and immunoglobulin E in inflammatory bowel disease.** *Gut* 1975; 16(11):861-866.
61. Miller HR, Pemberton AD. **Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut.** *Immunology* 2002; 105(4):375-390.
62. Miller H, Huntley J, Newlands G, Mackellar A, Lammas D, Wakelin D. **Granule proteinases define mast cell heterogeneity in the serosa and the gastrointestinal mucosa of the mouse.** *Immunology* 1988; 65(4):559.
63. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. **The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes.** *Nature Reviews Immunology* 2011; 11(7):445-456.
64. Talayero P, Mancebo E, Calvo-Pulido J, Rodríguez-Muñoz S, Bernardo I, Laguna-Goya R, et al. **Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.** *American Journal of Transplantation* 2016; 16(1):72-82.

65. Murphy K, Weaver C. **Janeway's immunobiology**. Garland Science; 2016.
66. Aw MM. **Transplant immunology**. *Journal of pediatric surgery* 2003; 38(9):1275-1280.
67. Simpson E. **Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956)'Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance'**. *Phil Trans R Soc B* 2015; 370(1666):20140382.
68. Gibson T, Medawar PB. **The fate of skin homografts in man**. *Journal of Anatomy* 1943; 77(Pt 4):299.
69. Medawar PB. **The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council**. *Journal of anatomy* 1944; 78(Pt 5):176.
70. Medawar PB. **A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council**. *Journal of anatomy* 1945; 79(Pt 4):157.
71. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, Medawar PB. **The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle**. *Heredity* 1951; 5(3):379.
72. Holman E. **Protein sensitization in isoskin grafting. Is the latter of practical value**. *Surg Gynecol Obstet* 1924; 38:100-106.
73. Schöne G. **Die heteroplastische und homooplastische**. Berlin: Springer; 1912.
74. Medawar P. **Immunity to homologous grafted skin. I. The suppression of cell division in grafts transplanted to immunized animals**. *British journal of experimental pathology* 1946; 27(1):9.
75. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. **Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins**. *Journal of the American Medical Association* 1956; 160(4):277-282.
76. Rosenthal AS, Shevach EM. **Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes: I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes**. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 138(5):1194-1212.
77. Doherty P, Blanden R, Zinkernagel R. **Specificity of Virus-Immune Effector T Cells for H-2K or H-2D Compatible Interactions: Implications for H-Antigen Diversity**. *Immunological Reviews* 1976; 29(1):89-125.
78. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B. **Cell interactions between histoincompatible t and b lymphocytes: ii. failure of physiologic cooperative interactions between t and b lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates**. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137(6):1405-1418.
79. Matis LA, Sorger SB, McElligott DL, Fink PJ, Hedrick SM. **The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones**. *Cell* 1987; 51(1):59-69.
80. Klein J. **Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex**. *Immunogenetics* 1986; 24(6):331-338.
81. Snell GD. **Methods for the study of histocompatibility genes**. *Journal of genetics* 1948; 49(2):87-108.

82. Trowsdale J. **“Both man & bird & beast”: comparative organization of MHC genes.** *Immunogenetics* 1995; 41(1):1-17.
83. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. **Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides.** *Science* 1996; 272(5264):1001-1004.
84. Bouvier M. **Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective.** *Molecular immunology* 2003; 39(12):697-706.
85. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. **Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA.** *Science* 1994; 265(5168):106-109.
86. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. **Direct observation of ligand recognition by T cells.** *Nature* 2002; 419(6909):845.
87. Holler PD, Kranz DM. **Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation.** *Immunity* 2003; 18(2):255-264.
88. Bjorkman PJ, Parham P. **Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules.** *Annual review of biochemistry* 1990; 59(1):253-288.
89. Li L, Dong M, Wang X-G. **The implication and significance of beta 2 microglobulin: A conservative multifunctional regulator.** *Chinese medical journal* 2016; 129(4):448.
90. Carlini F, Ferreira V, Buhler S, Tous A, Eliaou J-F, René C, et al. **Association of HLA-A and Non-Classical HLA Class I Alleles.** *PloS one* 2016; 11(10):e0163570.
91. Seliger B. **The non-classical antigens of HLA-G and HLA-E as diagnostic and prognostic biomarkers and as therapeutic targets in transplantation and tumors.** *Clinical transplants* 2013:465-472.
92. Rebmann V, da Silva Nardi F, Wagner B, Horn PA. **HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy.** *Journal of immunology research* 2014; 2014.
93. Pabón M, Navarro C, Osorio J, Gomez N, Moreno J, Donado A, et al. **Impact of human leukocyte antigen molecules e, f, and g on the outcome of transplantation.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2014. pp. 2957-2965.
94. Zhu Y, Rudensky AY, Corper AL, Teyton L, Wilson IA. **Crystal structure of MHC class II I-A_b in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-A_b peptide-binding motif.** *Journal of molecular biology* 2003; 326(4):1157-1174.
95. Appella E, Padlan E, Hunt D. **Analysis of the structure of naturally processed peptides bound by class I and class II major histocompatibility complex molecules.** *Exs* 1995; 73:105-119.
96. Liu Z, Sun Y-K, Xi Y-P, Maffei A, Reed E, Harris P, et al. **Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity.** *Journal of Experimental Medicine* 1993; 177(6):1643-1650.
97. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. **A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells.** *The Journal of Immunology* 2004; 173(8):4828-4837.

98. Spierings E. **Minor histocompatibility antigens: past, present, and future.** *HLA* 2014; 84(4):374-360.
99. Tan JC, Wadia PP, Coram M, Grumet FC, Kambham N, Miller K, et al. **HY antibody development associates with acute rejection in female patients with male kidney transplants.** *Transplantation* 2008; 86(1):75.
100. Dierselhuis M, Goulmy E. **The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation.** *Current opinion in organ transplantation* 2009; 14(4):419-425.
101. Montgomery RA, Cozzi E, West LJ, Warren DS. **Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation.** In: *Seminars in immunology*; Elsevier; 2011. pp. 224-234.
102. Platt JL. **Antibodies in transplantation.** *Discovery medicine* 2010; 10(51):125.
103. Gerlach UA, Lachmann N, Sawitzki B, Arsenic R, Neuhaus P, Schoenemann C, et al. **Clinical relevance of the de novo production of anti-HLA antibodies following intestinal and multivisceral transplantation.** *Transplant International* 2014; 27(3):280-289.
104. Anstee DJ. **Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing.** *Blood* 2009; 114(2):248-256.
105. Park WY, Kang SS, Park SB, Park UJ, Kim HT, Cho WH, et al. **Comparison of clinical outcomes between ABO-compatible and ABO-incompatible spousal donor kidney transplantation.** *Kidney research and clinical practice* 2016; 35(1):50-54.
106. S K, J D, S K, P G, P J. **From Incompatibility to Accommodation – The Journey of Taming ‘Self’: Guide to Perioperative Management of Solid Organ Transplantation across ABO and Rh Barrier.** *J Kidney* 2016; 2(2):122.
107. Mishra M, Mani H, Narula A, Saxena V. **HLA typing—a comparison of serology and DNA techniques.** *International Journal of Human Genetics* 2004; 4(2):151-153.
108. Tinckam KJ. **Basic histocompatibility testing methods.** In: *Core concepts in renal transplantation*; Springer; 2012. pp. 21-42.
109. Robinson J, Waller MJ, Parham P, Groot Nd, Bontrop R, Kennedy LJ, et al. **IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex.** *Nucleic acids research* 2003; 31(1):311-314.
110. Claas FH, Roelen DL, Oudshoorn M, Doxiadis II. **Future HLA matching strategies in clinical transplantation.** In: *Adequate HLA Matching in Keratoplasty*; Karger Publishers; 2003. pp. 62-73.
111. Duquesnoy RJ, Claas FH. **Is the application of HLAMatchmaker relevant in kidney transplantation?** *Transplantation* 2005; 79(2):250-251.
112. Olerup O, Zetterquist H. **HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation.** *HLA* 1992; 39(5):225-235.

113. Fleischhauer K, Zino E, Bordinon C, Benazzi E. **Complete generic and extensive fine-specificity typing of the HLA-B locus by the PCR-SSOP method.** *HLA* 1995; 46(4):281-292.
114. Petersdorf E, Hansen J. **A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing.** *HLA* 1995; 46(2):73-85.
115. Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, Guaní Guerra E. **The major histocompatibility complex in transplantation.** *Journal of transplantation* 2012; 2012.
116. Gupta A, Iveson V, Varagunam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. **Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant?** *Transplantation* 2008; 85(8):1200-1204.
117. Mahdi BM. **A glow of HLA typing in organ transplantation.** *Clinical and translational medicine* 2013; 2(1):6.
118. Saito PK, Yamakawa RH, Pereira S, Marques LC, Junior S, Veríssimo W, et al. **Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) to Detect Anti-HLA Antibodies: Old but Gold.** *Journal of clinical laboratory analysis* 2014; 28(4):275-280.
119. Santos RD, Langewisch ED, Norman DJ. **Immunological assessment of the transplant patient.** In: *Kidney Transplantation*: Springer; 2014. pp. 23-34.
120. Cecka J, Kucheryavaya A, Reinsmoen N, Leffell M. **Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches.** *American Journal of Transplantation* 2011; 11(4):719-724.
121. Patel R, Terasaki PI. **Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation.** *New England Journal of Medicine* 1969; 280(14):735-739.
122. Jackson AM. **The Virtual Crossmatch: An Essential Tool for Transplanting Sensitized Patients.** *Clinical transplants* 2014:131-136.
123. Amico P, Hönger G, Steiger J, Schaub S. **Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation.** *Current opinion in organ transplantation* 2009; 14(6):656-661.
124. Marino J, Paster J, Benichou G. **Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection.** *Frontiers in immunology* 2016; 7:582.
125. Harper SJ, Ali JM, Wlodek E, Negus MC, Harper IG, Chhabra M, et al. **CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112(41):12788-12793.
126. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. **A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell.** *Nature* 1998; 393(6684):474.
127. Cozzi E, Colpo A, De Silvestro G. **The mechanisms of rejection in solid organ transplantation.** *Transfusion and Apheresis Science* 2017; 56(4):498-505.
128. Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, et al. **A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy.** *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205(13):3133-3144.

129. Barbara JA, Turvey SE, Kingsley CI, Spriewald BM, Hara M, Witzke O, et al. **Islet allograft rejection can be mediated by cd4+, alloantigen experienced, direct pathway t cells of th1 and th2 cytokine phenotype1.** *Transplantation* 2000; 70(11):1641-1649.
130. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ. **Crosstalk between T and B cells in the germinal center after transplantation.** *Transplantation* 2017; 101(4):704-712.
131. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. **Effector mechanisms in transplant rejection.** *Immunological reviews* 2003; 196(1):51-64.
132. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. **Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells.** *The Lancet* 1966; 288(7465):662-665.
133. Williams GM, Hume DM, Hudson Jr RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. **Hyperacute renal-homograft rejection in man.** *New England Journal of Medicine* 1968; 279(12):611-618.
134. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi M-C. **Effector mechanisms of rejection.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2013; 3(11):a015461.
135. Ingulli E. **Mechanism of cellular rejection in transplantation.** *Pediatric nephrology* 2010; 25(1):61.
136. Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI, Ho E, Itescu S, Ravalli S, et al. **Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts.** *The Journal of clinical investigation* 1998; 101(2):398-405.
137. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, et al. **Indirect Allorecognition Of Major Histocompatibility Complex Allopeptides In Human Renal Transplant Recipients With Chronic Graft Dysfunction1.** *Transplantation* 1997; 64(6):795-800.
138. Mori DN, Kreisel D, Fullerton JN, Gilroy DW, Goldstein DR. **Inflammatory triggers of acute rejection of organ allografts.** *Immunological reviews* 2014; 258(1):132-144.
139. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. **Effects of brain death on organ quality and transplant outcome.** *Transplantation reviews* 2012; 26(2):54-59.
140. Danobeitia JS, Sperger JM, Hanson MS, Park EE, Chlebeck PJ, Roenneburg DA, et al. **Early activation of the inflammatory response in the liver of brain-dead non-human primates.** *Journal of Surgical Research* 2012; 176(2):639-648.
141. Koudstaal LG, A't Hart N, Ottens PJ, van den Berg A, Ploeg RJ, van Goor H, et al. **Brain death induces inflammation in the donor intestine.** *Transplantation* 2008; 86(1):148-154.
142. Eltzschig HK, Eckle T. **Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation.** *Nature medicine* 2011; 17(11):1391.
143. Takeuchi O, Akira S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 2010; 140(6):805-820.
144. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. **PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity.** *Immunological reviews* 2012; 249(1):158-175.
145. Meier D, Rumbo M, Gondolesi GE. **Current status of allograft tolerance in intestinal transplantation.** *International reviews of immunology* 2014; 33(3):245-260.

146. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. **Actively acquired tolerance'of foreign cells.** *Nature* 1953; 172:603-606.
147. Main JM, Prehn RT. **Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow.** *Journal of the National Cancer Institute* 1955; 15(4):1023-1029.
148. Mannick JA, Lochte HL, Ashley CA, Thomas ED, Ferrebee JW. **A functioning kidney homotransplant in the dog.** *Surgery* 1959; 46(4):821-828.
149. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy Jr JB, Dammin GJ. **Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins.** *New England journal of medicine* 1960; 262(25):1251-1260.
150. Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy Jr JB, Alexandre GW, Harrison JH. **Kidney transplantation in modified recipients.** *Annals of surgery* 1962; 156(3):337.
151. Hamburger J, Vaysse J, Crosnier J, Auvert J, Lalanne M, Hopper J. **Renal homotransplantation in man after radiation of the recipient: experience with six patients since 1959.** *The American journal of medicine* 1962; 32(6):854-871.
152. Kuss R, Legrain M, Mathe G, Nedey R, Camey M. **Homologous human kidney transplantation: experience with six patients.** *Postgraduate medical journal* 1962; 38(443):528.
153. Schwartz R, Dameshek W. **Drug-induced immunological tolerance.** *Nature* 1959; 183(4676):1682.
154. Schwartz R, Dameshek W, Donovan J. **The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions.** *The Journal of clinical investigation* 1960; 39(6):952-958.
155. Kahan BD. **Individuality: the barrier to optimal immunosuppression.** *Nature Reviews Immunology* 2003; 3(10):831.
156. Enderby C, Keller CA. **An overview of immunosuppression in solid organ transplantation.** *The American journal of managed care* 2015; 21(1 Suppl):s12-23.
157. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. **Immunosuppressive drug therapy.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2013; 3(9):a015487.
158. Organization WH. **Global glossary of terms and definitions on donation and transplantation.** Geneva: World Health Organization 2009.
159. Pironi L. **Definitions of intestinal failure and the short bowel syndrome.** *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2016; 30(2):173-185.
160. Lal S, Teubner A, Shaffer J. **Intestinal failure.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006; 24(1):19-31.
161. Pironi L, Konrad D, Brandt C, Joly F, Wanten G, Agostini F, et al. **Clinical classification of adult patients with chronic intestinal failure due to benign disease: An international multicenter cross-sectional survey.** *Clinical Nutrition* 2017.
162. Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. **Irreversible intestinal failure.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004; 38(3):250-269.

163. Kocoshis SA, Beath SV, Booth IW, Oliva CAG, Goulet O, Kaufman SS, et al. **Intestinal failure and small bowel transplantation, including clinical nutrition: Working Group report of the second World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004; 39:S655-S661.
164. Goulet O, Sauvat F. **Short bowel syndrome and intestinal transplantation in children.** *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2006; 9(3):304-313.
165. O'Keefe SJ, Buchman AL, Fishbein TM, Jeejeebhoy KN, Jeppesen PB, Shaffer J. **Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006; 4(1):6-10.
166. Rumbo C, Rubio JS, Ramisch D, Echevarria C, Nachman F, Niveyro S, et al. **Intestinal Rehabilitation and Transplantation at a Single Latin-American Center, Evolution of the Program and New Challenges.** *Transplantation* 2017; 101(6S2):S54.
167. Ramisch D, Rumbo C, Echevarria C, Moulin L, Niveyro S, Orce G, et al. **Long-term outcomes of intestinal and multivisceral transplantation at a single center in Argentina.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2016. pp. 457-462.
168. Dudrick SJ. **History of parenteral nutrition.** *Journal of the American College of Nutrition* 2009; 28(3):243-251.
169. Moon J, Iyer K. **Intestinal rehabilitation and transplantation for intestinal failure.** *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 2012; 79(2):256-266.
170. Rhoads JE, Vars HM, Dudrick SJ. **The development of intravenous hyperalimentation.** *Surgical Clinics of North America* 1981; 61(3):429-435.
171. Buccigrossi V, Armellino C, Tozzi A, Nicastro E, Esposito C, Alicchio F, et al. **Time-and segment-related changes of postresected intestine: a 4-dimensional model of intestinal adaptation.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2013; 56(1):40-45.
172. DiBaise JK. **Short bowel syndrome and small bowel transplantation.** *Current opinion in gastroenterology* 2014; 30(2):128-133.
173. Bielawska B, Allard JP. **Parenteral nutrition and intestinal failure.** *Nutrients* 2017; 9(5):466.
174. KING RF, NORTON T, HILL GL. **A double-blind crossover study of the effect of loperamide hydrochloride and codeine phosphate on ileostomy output.** *ANZ Journal of Surgery* 1982; 52(2):121-124.
175. Jeppesen P, Staun M, Tjellesen L, Mortensen P. **Effect of intravenous ranitidine and omeprazole on intestinal absorption of water, sodium, and macronutrients in patients with intestinal resection.** *Gut* 1998; 43(6):763-769.
176. DiBaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. **Enteric microbial flora, bacterial overgrowth, and short-bowel syndrome.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006; 4(1):11-20.
177. Pape U-F, Maasberg S, Pascher A. **Pharmacological strategies to enhance adaptation in intestinal failure.** *Current opinion in organ transplantation* 2016; 21(2):147-152.

178. Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Graff J, Lohmann J, Hansen BS, et al. **Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon.** *Gastroenterology* 2001; 120(4):806-815.
179. Jeppesen P, Gilroy R, Pertkiewicz M, Allard J, Messing B, O'keefe S. **Randomised placebo-controlled trial of teduglutide in reducing parenteral nutrition and/or intravenous fluid requirements in patients with short bowel syndrome.** *Gut* 2011;gut. 2010.218271.
180. O'keefe SJ, Jeppesen PB, Gilroy R, Pertkiewicz M, Allard JP, Messing B. **Safety and efficacy of teduglutide after 52 weeks of treatment in patients with short bowel intestinal failure.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013; 11(7):815-823. e813.
181. Gondolesi GE, Pattín F, Nikkoupur H. **Management of intestinal failure in middle-income countries, for children and adults.** *Current opinion in organ transplantation* 2018.
182. Hommel MJ, van Baren R, Haveman JW. **Surgical management and autologous intestinal reconstruction in short bowel syndrome.** *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2016; 30(2):263-280.
183. Jeejeebhoy K. **Total parenteral nutrition at home for 23 months, without complication, and with good rehabilitation. A study of technical and metabolic features.** *Gastroenterology* 1973; 65(5):811-820.
184. Dibb M, Soop M, Teubner A, Shaffer J, Abraham A, Carlson G, et al. **Survival and nutritional dependence on home parenteral nutrition: three decades of experience from a single referral centre.** *Clinical Nutrition* 2017; 36(2):570-576.
185. Fishbein TM. **Intestinal transplantation.** *New England Journal of Medicine* 2009; 361(10):998-1008.
186. Tzvetanov IG, Oberholzer J, Benedetti E. **Current status of living donor small bowel transplantation.** *Current opinion in organ transplantation* 2010; 15(3):346-348.
187. Matsumoto CS, Fishbein TM. **Modified multivisceral transplantation with splenopancreatic preservation.** *Transplantation* 2007; 83(2):234-236.
188. Bharadwaj S, Tandon P, Gohel TD, Brown J, Steiger E, Kirby DF, et al. **Current status of intestinal and multivisceral transplantation.** *Gastroenterology report* 2017; 5(1):20-28.
189. Reyes J, Mazariegos GV, Bond G, Green M, Dvorchik I, Kosmach-Park B, et al. **Pediatric intestinal transplantation: historical notes, principles and controversies.** *Pediatric transplantation* 2002; 6(3):193-207.
190. Gondolesi GE, Meier D, Rumbo C, Ramisch D, Echevarría C, Nachman F, et al. **Trasplante intestinal desde la clínica a la investigación traslacional: contribuciones de una unidad integral de insuficiencia intestinal, rehabilitación y trasplante.** *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 2015; 45(3).
191. Pironi L, Hébuterne X, Van Gossum A, Messing B, Lyszkowska M, Colomb V, et al. **Candidates for intestinal transplantation: a multicenter survey in Europe.** *The American journal of gastroenterology* 2006; 101(7):1633.

192. Loo L, Vrakas G, Reddy S, Allan P. **Intestinal transplantation: a review.** *Current opinion in gastroenterology* 2017; 33(3):203-211.
193. Lillehei R, Idezuki Y, Feemster J, Dietzman R, Kelly W, Merkel F, et al. **Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations.** *Surgery* 1967; 62(4):721-741.
194. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. **The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival.** *Annals of surgery* 1959; 150(4):543.
195. Starzl T, Kaupp Jr HA. **Mass homotransplantation of abdominal organs in dogs.** In: *Surgical forum: NIH Public Access*; 1960. pp. 28.
196. Starzl TE, Rowe MI, Todo S, Jaffe R, Tzakis A, Hoffman AL, et al. **Transplantation of multiple abdominal viscera.** *JAMA: the journal of the American Medical Association* 1989; 261(10):1449.
197. Grant D. **Current results of intestinal transplantation.** *The Lancet* 1996; 347(9018):1801-1803.
198. Kubal CA, Mangus RS, Tector AJ. **Intestine and multivisceral transplantation: current status and future directions.** *Current gastroenterology reports* 2015; 17(1):5.
199. Alican F, Hardy JD, Cayirli M, Varner JE, Moynihan PC, Turner MD, et al. **Intestinal transplantation: laboratory experience and report of a clinical case.** *The American Journal of Surgery* 1971; 121(2):150-159.
200. O'Keefe SJ, Matarese L. **Small bowel transplantation.** *Current gastroenterology reports* 2006; 8(5):360-366.
201. Starzl T, Fung J, Venkataramman R, Todo S, Demetris A, Jain A. **FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation.** *The Lancet* 1989; 334(8670):1000-1004.
202. Grant D, Abu-Elmagd K, Mazariegos G, Vianna R, Langnas A, Mangus R, et al. **Intestinal transplant registry report: global activity and trends.** *American Journal of Transplantation* 2015; 15(1):210-219.
203. Smith J, Weaver T, Skeans M, Horslen S, Harper A, Snyder J, et al. **OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Intestine.** *American Journal of Transplantation* 2018; 18(S1):254-290.
204. Cai J, Wu G, Qing A, Everly M, Cheng E, Terasaki P. **Organ Procurement and Transplantation Network/Scientific Registry of Transplant Recipients 2014 Data Report: Intestine.** *Clinical transplants* 2014:33-47.
205. Newell KA. **Transplantation of the intestine: is it truly different?** *American Journal of Transplantation* 2003; 3(1):1-2.
206. Mayer L. **Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2000; 30(1):S4-S12.
207. Meier D, Cagnola H, Ramisch D, Rumbo C, Chirido F, Docena G, et al. **Analysis of immune cells draining from the abdominal cavity as a novel tool to study intestinal transplant immunobiology.** *Clinical & Experimental Immunology* 2010; 162(1):138-145.

208. Iwaki Y, Starzl TE, Yagihashi A, Taniwaki S, Abu-Elmagd K, Tzakis A, et al. **Replacement of donor lymphoid tissue in small-bowel transplants.** *The Lancet* 1991; 337(8745):818-819.
209. Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos R, et al. **Liver, kidney, and thoracic organ transplantation under FK 506.** *Annals of surgery* 1990; 212(3):295.
210. Abu-Elmagd K, Reyes J, Todo S, Rao A, Lee R, Irish W, et al. **Clinical Intestinal Transplantation: New Perspectives and Immunologic Considerations 1.** *Journal of the American College of Surgeons* 1998; 186(5):512-527.
211. Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K, Reyes J, Nakamura K, Casavilla A, et al. **Intestinal transplantation in composite visceral grafts or alone.** *Annals of surgery* 1992; 216(3):223.
212. Gondolessi G, Blondeau B, Maurette R, Hoppenhauer L, Rodriguez-Laiz G, Schiano T, et al. **Pretransplant immunomodulation of highly sensitized small bowel transplant candidates with intravenous immune globulin.** *Transplantation* 2006; 81(12):1743-1746.
213. Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid M, et al. **Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2004. pp. 335-337.
214. Kato T, Mizutani K, Terasaki P, Quintini C, Selvaggi G, Thompson J, et al. **Association of emergence of HLA antibody and acute rejection in intestinal transplant recipients: a possible evidence of acute humoral sensitization.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2006. pp. 1735-1737.
215. Ruiz P, Garcia M, Pappas P, Berney T, Esquenazi V, Kato T, et al. **Mucosal Vascular Alterations in Isolated Small-Bowel Allografts: Relationship to Humoral Sensitization.** *American Journal of Transplantation* 2003; 3(1):43-49.
216. Tsai H-L, Island ER, Chang J-W, Gonzalez-Pinto I, Tryphonopoulos P, Nishida S, et al. **Association between donor-specific antibodies and acute rejection and resolution in small bowel and multivisceral transplantation.** *Transplantation* 2011; 92(6):709-715.
217. Trentadue G, Dijkstra G. **Current understanding of alloimmunity of the intestinal graft.** *Current opinion in organ transplantation* 2015; 20(3):286-294.
218. Nagai S, Mangus RS, Anderson E, Ekser B, Kubal CA, Fridell JA, et al. **Intestinal Graft Failure: Should We Perform the Allograft Enterectomy Before or With Retransplantation?** *Transplantation* 2017; 101(2):411-420.
219. Fishman JA, Rubin RH. **Infection in organ-transplant recipients.** *New England Journal of Medicine* 1998; 338(24):1741-1751.
220. Cicalese L, Sileri P, Green M, Abu-Elmagd K, Kocoshis S, Reyes J. **Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation.** *Transplantation* 2001; 71(10):1414-1417.
221. Guaraldi G, Cocchi S, Codeluppi M, Di Benedetto F, De Ruvo N, Masetti M, et al. **Outcome, incidence, and timing of infectious complications in small bowel and multivisceral organ transplantation patients.** *Transplantation* 2005; 80(12):1742-1748.
222. Timpone JG, Girlanda R, Rudolph L, Fishbein TM. **Infections in intestinal and multivisceral transplant recipients.** *Infectious Disease Clinics* 2013; 27(2):359-377.

223. Loinaz C, Kato T, Nishida S, Wepler D, Levi D, Dowdy L, et al. **Bacterial infections after intestine and multivisceral transplantation. The experience of the University of Miami (1994-2001).** *Hepato-gastroenterology* 2006; 53(68):234-242.
224. Primeggia J, Matsumoto C, Fishbein T, Karacki P, Fredette T, Timpone J. **Infection among adult small bowel and multivisceral transplant recipients in the 30-day postoperative period.** *Transplant Infectious Disease* 2013; 15(5):441-448.
225. Florescu DF, Qiu F, Lagnas AN, Mercer DF, Chambers H, Hill LA, et al. **Bloodstream infections during the first year after pediatric small bowel transplantation.** *The Pediatric infectious disease journal* 2012; 31(7):700-704.
226. Ziring D, Tran R, Edelstein S, McDiarmid SV, Vargas J, Cortina G, et al. **Infectious enteritis after intestinal transplantation: incidence, timing, and outcome.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2004. pp. 379-380.
227. Adeyi O, Costa G, Abu-Elmagd K, Wu T. **Rotavirus infection in adult small intestine allografts: a clinicopathological study of a cohort of 23 patients.** *American Journal of Transplantation* 2010; 10(12):2683-2689.
228. Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Jaffe R, Bond G, Sindhi R, Martin L, et al. **Graft versus host disease in intestinal transplantation.** *American Journal of Transplantation* 2004; 4(9):1459-1465.
229. Cromvik J, Varkey J, Herlenius G, Johansson J-E, Wennerås C. **Graft-versus-host disease after intestinal or multivisceral transplantation: a Scandinavian single-center experience.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2016. pp. 185-190.
230. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, Soltys K, Sindhi R, Wu T, et al. **Five hundred intestinal and multivisceral transplantations at a single center: major advances with new challenges.** *Annals of surgery* 2009; 250(4):567-581.
231. Mangus RS, Tector AJ, Kubal CA, Fridell JA, Vianna RM. **Multivisceral transplantation: expanding indications and improving outcomes.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2013; 17(1):179-187.
232. Wu G, Selvaggi G, Nishida S, Moon J, Island E, Ruiz P, et al. **Graft-versus-host disease after intestinal and multivisceral transplantation.** *Transplantation* 2011; 91(2):219-224.
233. Allen U, Preiksaitis J. **Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplantation.** *American Journal of Transplantation* 2013; 13(s4):107-120.
234. Abu-Elmagd KM, Mazariegos G, Costa G, Soltys K, Bond G, Sindhi R, et al. **Lymphoproliferative disorders and de novo malignancies in intestinal and multivisceral recipients: improved outcomes with new outlooks.** *Transplantation* 2009; 88(7):926-934.
235. Suzuki M, Mujtaba M, Sharfuddin A, Yaqub M, Mishler D, Faiz S, et al. **Risk factors for native kidney dysfunction in patients with abdominal multivisceral/small bowel transplantation.** *Clinical transplantation* 2012; 26(4).
236. Abu-Elmagd KM, Kosmach-Park B, Costa G, Zenati M, Martin L, Koritsky DA, et al. **Long-term survival, nutritional autonomy, and quality of life after intestinal and multivisceral transplantation.** *Annals of surgery* 2012; 256(3):494-508.

237. Sudan D. **The current state of intestine transplantation: indications, techniques, outcomes and challenges.** *American Journal of Transplantation* 2014; 14(9):1976-1984.
238. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. **Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ.** *New England Journal of Medicine* 2003; 349(10):931-940.
239. Berger M, Zeevi A, Farmer D, Abu-Elmagd K. **Immunologic challenges in small bowel transplantation.** *American Journal of Transplantation* 2012; 12(s4).
240. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, Wu T, Murase N, Zeevi A, et al. **Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance.** *Transplant International* 2009; 22(1):96-109.
241. Tzakis AG, Kato T, Levi DM, DeFaria W, Selvaggi G, Weppler D, et al. **100 multivisceral transplants at a single center.** *Annals of surgery* 2005; 242(4):480.
242. Sudan DL, Kaufman SS, Shaw Jr BW, Fox IJ, McCashland TM, Schafer DF, et al. **Isolated intestinal transplantation for intestinal failure.** *The American journal of gastroenterology* 2000; 95(6):1506-1515.
243. Rege A, Sudan D. **Intestinal transplantation.** *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2016; 30(2):319-335.
244. Houlihan BK, Cha P, Aguirre O, Khalid K, Kaufman S, Girlanda R, et al. **The Holy Grail: operational tolerance in intestinal transplantation.** *Transplantation* 2017; 101(6S2):S96.
245. Yeh J, Ngo KD, Wozniak LJ, Vargas JH, Marcus EA, McDiarmid SV, et al. **Endoscopy Following Pediatric Intestinal Transplant: A 23 Year Single Center Experience.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2015; 61(6):636.
246. Elmore S. **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicologic pathology* 2007; 35(4):495-516.
247. King K, Cidlowski J. **Cell cycle regulation and apoptosis.** *Annual review of physiology* 1998; 60(1):601-617.
248. Opferman JT, Korsmeyer SJ. **Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.** *Nature immunology* 2003; 4(5):410.
249. Cohen GM. **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochemical Journal* 1997; 326(Pt 1):1.
250. Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA. **Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors.** *Immunity* 2003; 18(3):319-329.
251. Ashkenazi A, Dixit VM. **Death receptors: signaling and modulation.** *Science* 1998:1305-1308.
252. Karin M, Clevers H. **Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration.** *Nature* 2016; 529(7586):307-315.
253. van der Flier LG, Clevers H. **Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium.** *Annual review of physiology* 2009; 71:241-260.

254. Clevers HC, Bevins CL. **Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts.** *Annual review of physiology* 2013; 75:289-311.
255. Bevins CL, Salzman NH. **Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis.** *Nature Reviews Microbiology* 2011; 9(5):356-368.
256. Matsumoto CS, Zasloff MA, Fishbein TM. **Chronic mucosal inflammation/inflammatory bowel disease-like inflammation after intestinal transplantation: where are we now?** *Current opinion in organ transplantation* 2014; 19(3):276-280.
257. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. **Reduced α -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease.** *Gut* 2008; 57(7):903-910.
258. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, et al. **NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression.** *Gut* 2004; 53(11):1658-1664.
259. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. **Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease.** *Journal of leukocyte biology* 2005; 77(4):460-465.
260. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, et al. **Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease.** *Immunity* 2012; 37(2):339-350.
261. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, et al. **Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins.** *Blood* 2012; 120(1):223-231.
262. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. **Acute graft-versus-host disease: novel biological insights.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2016; 22(1):11-16.
263. Fishbein T, Novitskiy G, Lough D, Matsumoto C, Kaufman S, Shetty K, et al. **Rejection reversibly alters enteroendocrine cell renewal in the transplanted small intestine.** *American Journal of Transplantation* 2009; 9(7):1620-1628.
264. Gondolessi G, Fauda M. **Technical refinements in small bowel transplantation.** *Current opinion in organ transplantation* 2008; 13(3):259-265.
265. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method.** *methods* 2001; 25(4):402-408.
266. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. **Ischemia—reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury.** *Digestive diseases and sciences* 2004; 49(9):1359-1377.
267. Massberg S, Messmer K. **The nature of ischemia/reperfusion injury.** In: *Transplantation proceedings*; Elsevier; 1998. pp. 4217-4223.
268. Grootjans J, Hodin CM, de Haan JJ, Derikx JP, Rouschop KM, Verheyen FK, et al. **Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion.** *Gastroenterology* 2011; 140(2):529-539. e523.

269. Park P, Haglund U, Bulkley G, Fält K. **The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion.** *Surgery* 1990; 107(5):574-580.
270. Trevizol A, David A, Dias E, Mantovani D, Pécora R, D'Albuquerque L. **Intestinal and multivisceral transplantation immunosuppression protocols—literature review.** In: *Transplantation proceedings*: Elsevier; 2012. pp. 2445-2448.
271. Yoshitoshi E, Yoshizawa A, Ogawa E, Kaneshiro M, Takada N, Okamoto S, et al. **The challenge of acute rejection in intestinal transplantation.** *Pediatric surgery international* 2012; 28(8):855-859.
272. Basak O, van de Born M, Korving J, Beumer J, van der Elst S, van Es JH, et al. **Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele.** *The EMBO journal* 2014:e201488017.
273. Li L, Clevers H. **Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals.** *Science* 2010; 327(5965):542-545.
274. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, et al. **The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2011;jem. 20101559.
275. Levine JE, Huber E, Hammer ST, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, et al. **Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality.** *Blood* 2013; 122(8):1505-1509.
276. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. **The pathophysiology of acute graft-versus-host disease.** *International journal of hematology* 2003; 78(3):181-187.
277. Talmon GA, Saigh QM, DiMaio D, Wisecarver JL, Radio SJ. **Characterization of epithelial apoptosis in biopsies of small-bowel allografts using cleaved caspase 3 immunostaining.** *International journal of surgical pathology* 2010; 18(6):482-487.
278. Chu F-F, Esworthy RS, Doroshov JH, Grasberger H, Donko A, Leto TL, et al. **Deficiency in Duox2 activity alleviates ileitis in GPx1-and GPx2-knockout mice without affecting apoptosis incidence in the crypt epithelium.** *Redox biology* 2017; 11:144-156.
279. Kajino-Sakamoto R, Inagaki M, Lippert E, Akira S, Robine S, Matsumoto K, et al. **Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis.** *The Journal of Immunology* 2008; 181(2):1143-1152.
280. Kajino-Sakamoto R, Omori E, Nighot PK, Blikslager AT, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. **TGF- β -Activated Kinase 1 Signaling Maintains Intestinal Integrity by Preventing Accumulation of Reactive Oxygen Species in the Intestinal Epithelium.** *The Journal of Immunology* 2010; 185(8):4729-4737.
281. Kroemer A, Cosentino C, Kaiser J, Matsumoto CS, Fishbein TM. **Intestinal Transplant Inflammation: the Third Inflammatory Bowel Disease.** *Current gastroenterology reports* 2016; 18(11):56.
282. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. **Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs.** *Science* 2015; 350(6263):981-985.

283. Bando JK, Colonna M. **Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity.** *Nature immunology* 2016; 17(7):783.
284. Forkel M, Mjösberg J. **Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease.** *Current allergy and asthma reports* 2016; 16(10):73.
285. Cella M, Otero K, Colonna M. **Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(24):10961-10966.
286. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, et al. **Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis.** *Science* 2014; 343(6178):1249288.
287. Longman RS, Diehl GE, Victorio DA, Huh JR, Galan C, Miraldi ER, et al. **CX3CR1+ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22.** *Journal of Experimental Medicine* 2014;jem. 20140678.
288. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. **STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing.** *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(7):1465-1472.
289. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. **Interleukin-22: immunobiology and pathology.** *Annual review of immunology* 2015; 33:747-785.
290. Song C, Lee JS, Gilfillan S, Robinette ML, Newberry RD, Stappenbeck TS, et al. **Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation.** *Journal of Experimental Medicine* 2015;jem. 20151403.
291. Qiu J, Heller JJ, Guo X, Zong-ming EC, Fish K, Fu Y-X, et al. **The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells.** *Immunity* 2012; 36(1):92-104.
292. Powell N, Walker AW, Stolarczyk E, Canavan JB, Gökmen MR, Marks E, et al. **The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells.** *Immunity* 2012; 37(4):674-684.
293. Geiger TL, Abt MC, Gasteiger G, Firth MA, O'Connor MH, Geary CD, et al. **Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host protection against intestinal pathogens.** *Journal of Experimental Medicine* 2014;jem. 20140212.
294. Abt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Sušac B, et al. **Innate immune defenses mediated by two ILC subsets are critical for protection against acute *Clostridium difficile* infection.** *Cell host & microbe* 2015; 18(1):27-37.
295. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-weidner K, Leibundgut-landmann S. **141 IL-17-secreting Innate Lymphoid Cells are Essential for Host Defense Against Fungal Infection.** *Respiration* 2013; 85(6):554.
296. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, et al. **Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria.** *Science* 2012; 336(6086):1321-1325.

297. Peters CP, Hoorweg K, Cornelissen F, Aparicio-Domingo P, Papazian N, Kazemier G, et al. **Functional differences between human NKp44-and NKp44 RORC innate lymphoid cells.** *Crohn's* 2014;57.
298. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R, et al. **Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria.** *Nature* 2013; 498(7452):113-117.
299. Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J, et al. **Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells.** *Science* 2015; 348(6238):1031-1035.
300. Crellin NK, Trifari S, Kaplan CD, Satoh-Takayama N, Di Santo JP, Spits H. **Regulation of cytokine secretion in human CD127+ LTi-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2.** *Immunity* 2010; 33(5):752-764.
301. Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash DV, Winsauer C, Prepens S, Seleznik GM, et al. **Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis.** *Science* 2013; 342(6163):1243-1246.
302. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, et al. **Imbalance of NKp44+ NKp46- and NKp44- NKp46+ natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2010; 139(3):882-892. e883.
303. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J. **Cellular responses to interferon- γ .** *Annual review of immunology* 1997; 15(1):749-795.
304. Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, et al. **IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease.** *Journal of Experimental Medicine* 2011;jem. 20101712.
305. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. **Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology.** *Nature* 2010; 464(7293):1371.
306. Munneke JM, Björklund AT, Mjösberg JM, Garming-Legert K, Bernink JH, Blom B, et al. **Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease.** *Blood* 2014; 124(5):812-821.
307. Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, Thornton E, Franchini F, Szabady RL, et al. **Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model.** *Journal of Experimental Medicine* 2013; 210(5):917-931.
308. Li H, Richert-Spuhler LE, Evans TI, Gillis J, Connole M, Estes JD, et al. **Hypercytotoxicity and rapid loss of NKp44+ innate lymphoid cells during acute SIV infection.** *PLoS pathogens* 2014; 10(12):e1004551.
309. Kløverpris HN, Kazer SW, Mjösberg J, Mabuka JM, Wellmann A, Ndhlovu Z, et al. **Innate lymphoid cells are depleted irreversibly during acute HIV-1 infection in the absence of viral suppression.** *Immunity* 2016; 44(2):391-405.

310. Krämer B, Goeser F, Lutz P, Glässner A, Boesecke C, Schwarze-Zander C, et al. **Compartment-specific distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy.** *PLoS pathogens* 2017; 13(5):e1006373.
311. Li J, Doty AL, Tang Y, Berrie D, Iqbal A, Tan SA, et al. **Enrichment of IL-17A (+) IFN- γ (+) and IL-22 (+) IFN- γ (+) T cell Subsets Is Associated with Reduction of NKp44 (+) ILC3s in the Terminal Ileum of Crohn's Disease Patients.** *Clinical & Experimental Immunology* 2017.
312. Mühl H, Scheiermann P, Bachmann M, Härdle L, Heinrichs A, Pfeilschifter J. **IL-22 in tissue-protective therapy.** *British journal of pharmacology* 2013; 169(4):761-771.
313. Xie M-H, Aggarwal S, Ho W-H, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. **Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R.** *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(40):31335-31339.
314. Nagem RAP, Colau D, Dumoutier L, Renauld J-C, Ogata C, Polikarpov I. **Crystal structure of recombinant human interleukin-22.** *Structure* 2002; 10(8):1051-1062.
315. Xu T, Logsdon NJ, Walter MR. **Structure of insect-cell-derived IL-22.** *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 2005; 61(7):942-950.
316. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld J-C. **Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line Pathways that are shared with and distinct from IL-10.** *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(37):33676-33682.
317. Dumoutier L, de Meester C, Tavernier J, Renauld J-C. **New activation modus of STAT3 a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain.** *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(39):26377-26384.
318. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. **IL-22 increases the innate immunity of tissues.** *Immunity* 2004; 21(2):241-254.
319. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. **IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade.** *Cytokine* 2012; 60(1):38-42.
320. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. **IL-22, cell regeneration and autoimmunity.** *Cytokine* 2015; 74(1):35-42.
321. Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, O'Connor MH, Dudakov JA, Jenq RR, et al. **Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration.** *Nature* 2015.
322. Killig M, Glatzer T, Romagnani C. **Recognition strategies of group 3 innate lymphoid cells.** *Frontiers in immunology* 2014; 5.
323. Sonnenberg GF, Artis D. **Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation.** *Nature medicine* 2015; 21(7):698-708.
324. von Burg N, Chappaz S, Baerenwaldt A, Horvath E, Dasgupta SB, Ashok D, et al. **Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111(35):12835-12840.

325. Meier D, Docena G, Ramisch D, Toscanini U, Berardi G, Gondolesi G, et al. **Immunological status of isolated lymphoid follicles after intestinal transplantation.** *American Journal of Transplantation* 2014; 14(9):2148-2158.
326. Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, Hernandez PP, Kiss EA, Hoyler T, et al. **Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t+ innate lymphocytes.** *Immunity* 2010; 33(5):736-751.
327. Verrier T, Satoh-Takayama N, Serafini N, Marie S, Di Santo JP, Vosshenrich CA. **Phenotypic and functional plasticity of murine intestinal NKp46+ group 3 innate lymphoid cells.** *The Journal of Immunology* 2016; 196(11):4731-4738.
328. Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K, Kofoed-Nielsen M, et al. **Interleukin-12 and-23 control plasticity of CD127+ group 1 and group 3 innate lymphoid cells in the intestinal lamina propria.** *Immunity* 2015; 43(1):146-160.
329. Houlihan B, Cha P, Zasloff M, Fishbein TM, Kroemer A. **An integrated understanding of the immunology of allograft inflammation.** *Current opinion in organ transplantation* 2017; 22(2):155-159.
330. Grant D. **Intestinal transplantation: current status.** In: *Transplantation proceedings*; 1989. pp. 2869-2871.
331. Grant D, Wall W, Mimeault R, Zhong R, Ghent C, Garcia B, et al. **Successful small-bowel/liver transplantation.** *The Lancet* 1990; 335(8683):181-184.
332. Li X-C, Almawi W, Jevnikar A, Tucker J, Zhong R, Grant D. **Allogeneic lymphocyte proliferation stimulated by small intestine-derived epithelial cells.** *Transplantation* 1995; 60(1):82-89.
333. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. **IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis.** *The Journal of clinical investigation* 2008; 118(2):534-544.